

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire – CNRS UPR4301

THÈSE présentée par :

Kyangwi Patrick MALIKIDOGO

soutenue le : **21 Décembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : **Chimie**

**Agents de contraste pour la détection
quantitative du Zn(II) par IRM**

THÈSE dirigée par :

Dr. Eva JAKAB-TOTH

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Co-encadrants :

Dr. Célia BONNET

Chargée de Recherche, CNRS, Orléans

Dr. Jean-François MORFIN

Ingénieur de Recherche, CNRS, Orléans

RAPPORTEURS :

Dr. Angélique SOUR

Chargée de Recherche, CNRS, Strasbourg

Dr. Olivier SENEQUE

Chargé de Recherche, CEA, Grenoble

JURY

Pr. Josef HAMACEK

Professeur, Université d'Orléans, Orléans

Dr. Angélique SOUR

Chargée de Recherche, CNRS, Strasbourg

Dr. Olivier SENEQUE

Chargé de Recherche, CEA, Grenoble

Pr. Bernold HASENKNOPF

Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Dr. Eva JAKAB-TOTH

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

Dr. Célia BONNET

Chargée de Recherche, CNRS, Orléans

À la famille AKILIMALI, MALIKIDOGO, AMUNDALA, ABESO, ANTONIO

À mes grands-parents Hangi MALIKIDOGO et Mwasi YALALA

À toutes les femmes violées à l'est de la R. D. Congo,

*À ma défunte mère Rose MALIKIDOGO décédée le 24 décembre 2000
et à ma tante Kabira MALIKIDOGO décédée le 29 décembre 2017.*

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) à Orléans, et a été financée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) sous le pseudonyme « ZiCoRes ». Un grand merci à l'ANR pour le financement.

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu pour la force ainsi que la patience qu'il m'a accordé pour surmonter toutes les épreuves vécues dans ma vie.

Je remercie les membres du jury, Dr. Angélique SOUR, Dr. Olivier SENEQUE, Pr. Josef HAMACEK et Pr. Bernold HASENKNOFF qui me font l'honneur d'examiner mon travail de thèse. Je les remercie également pour l'attention qu'ils ont porté à la lecture de mon manuscrit et pour la qualité de la discussion que nous avons pu avoir à la suite de ma soutenance de thèse.

Comme disent les Belges « L'union fait la force ». Ce travail de thèse en est un exemple. Au cours de cette thèse j'ai eu l'occasion de réaliser de nombreuses rencontres scientifiques, amicales et humaines qui m'ont permis d'aboutir ce travail en y contribuant de près ou de loin.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à ma directrice de Thèse Dr. Eva JAKAB-TOTH pour m'avoir accueilli et m'avoir fait bénéficier de l'expertise de son équipe. Eva, j'admire ton vaste esprit scientifique qui a été d'une grande aide pendant ce projet. Grâce à toi j'ai pu rencontrer des grands scientifiques du domaine de l'imagerie moléculaire. Je n'oublierai jamais le bon moment que j'ai passé au CBM en général et dans ton équipe en particulier.

Un immense merci à mes co-encadrants, Dr. Célia BONNET et Dr. Jean-François MORFIN pour m'avoir encadré tout au long de cette Thèse.

Célia, merci beaucoup pour m'avoir accepté en stage de master puis en thèse et pour m'avoir fait confiance pour ce sujet innovant. Tu n'as pas ménagé ta disponibilité et j'ai pu bénéficier de ton encadrement quotidien, malgré les multiples responsabilités au sein de l'équipe. Merci de m'avoir toujours soutenu dans des moments difficiles « ça cyclise, il a perdu un bras. » C'est vrai, j'avais perdu beaucoup de bras. Merci pour avoir dirigé ce

projet. Ton enthousiasme, tes connaissances scientifiques ainsi que ta rigueur m'ont permis de mener à bien ce travail. J'admire ton esprit scientifique. Au-delà de l'assistance théorique et pratique que tu m'as apportée, je retiendrai surtout tes qualités humaines. « Asante sana, mwenyezi Mungu akubariki »

Jean-François (Chef), merci pour ta patience, c'est vrai qu'au début j'étais lourd à supporter. Mais au cours du temps, j'ai réalisé que c'est toi le Chef puisque tu m'as montré le vrai chemin de la synthèse organique « il faut toujours faire des CCM et avoir un produit pur sinon tu auras du mal à obtenir un produit pur..... ». Merci pour tes conseils. J'admire vraiment tes compétences en chimie organique et je confirme encore une fois que tu es bien un chef. J'aimerais tout de même te poser une question : qu'est-ce qui va se passer dans la saison 8 de « The walking dead » ? En tout cas, merci pour tout.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe. Je pense particulièrement à l'assistante-ingénieur Agnès PALLIER qui m'a apporté son aide du début à la fin. Agnès, je n'ai pas vraiment une phrase qui exprimerait ma reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour moi. C'est qui est vrai est que je n'oublierai jamais. Dis à tes filles merci beaucoup pour avoir partagé leurs crevettes avec moi le jour où nous sommes passés chez toi. Merci beaucoup.

Je tiens à remercier Dr. Sara LACERDA pour m'avoir aidé et formé au radiomarquage. Sara, je suis sûr d'avoir bien écrit ton nom !!!!. Merci beaucoup de m'avoir initié à la radiochimie. Tes conseils m'ont vraiment aidé. Merci infiniment à toi, pour ta contribution dans ce projet et pour avoir commandé les capsules pour nous.

Des remerciements particuliers vont à Isidro DA SILVA du CEMTHI et Laurent BARANTIN pour leur collaboration dans l'étape de la quantification et l'imagerie IRM. Isidro, je ne peux plus avoir peur de la radioactivité comme la première fois que je suis entré dans le labo de radiochimie. En tout cas, je te remercie pour ta participation.

Je tiens à remercier aussi Pr. Lothar Helm pour m'avoir accueilli pendant 20 jours au sein de son laboratoire pour réaliser les mesures en relaxométrie. Il m'a beaucoup aidé malgré sa préparation à son départ à la retraite.

A special thanks to Dr. Gyula TIRCSO for sharing your high knowledge and your precious time with me. Thanks to Dr. Kristina DJANASHVILI.

Merci à Fabienne MEDUCIN, Corine GALINDO pour m'avoir initié à l'enseignement.
Merci pour les 3 années de TP Chimie en solution.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe : Eva, Célia, Jean-François, Sara, Agnès, Sandra (merci pour le verre), William, Fréd (contrepètrie), Dounia, Maamar, Saida (Wechhh LaDIVA), Fatima (cousine) pour tous les bons moments que j'ai passé avec vous. Grâce à vous j'ai appris à préparer un gâteau.

Merci à toutes les personnes qui ont travaillé à mes côtés (au 3^{ème} étage). Je remercie Vincent Aucagne pour ses conseils, Mathieu Galibert, Victor Terrier, Dominique Lelièvre, et Mehdi Amoura (De Gaule, Oussama, Bombardier) pour avoir partagé un peu de leur connaissance. De Gaule, dis à Maamar que c'est de l'huuuuuuuuuile.

Merci aux compagnons de « galère » avec qui j'ai eu le plaisir de rigoler et discuter pendant les années passées au CBM.

Muchas gracias a ti Alba Casas (La Muchacha) por el agradable momento pasado juntos.
Dounia (Doudou, cousine), je sais que tu n'es pas la mère de tout le monde mais je tiens tout de même à te dire merci pour les câlins cousine. Merci d'avoir été là pour moi et d'avoir été ma secrétaire pendant mon mandat à la présidence de l'ADOC.

Maamar (Zhang Lee, Caresse) mon allié 非常感谢你 你在刚果受到欢迎 我们是一个家庭。ذ عرفك أن سرورنا دواعي لمن إنه. Bon Maamar, je viens de te montrer qu'à force de rester toujours avec toi, l'arabe est devenue ma deuxième langue maternelle. Je ne veux plus garder tes secrets : Miss mayonnaise, Third, Brest, ...

Sophie, j'admets que j'aurai presque réussi à te rendre folle. Mais on a quand même passé des bons moments ensemble surtout à Beaune « tchuuu, ce qui se passe à Vegas reste à Vegas et ce qui se passe à Beaune reste à Beaune ». Tu te souviens du mec qui nous a récupérés dans sa voiture sous la pluie... La vérité est que, si je deviens président du Congo, je ferai appelle à toi.

Je remercie également Hervé Meudal pour son aide en RMN. Merci à Guillaume Gabant et Cyril Colas pour les analyses de spectrométrie de masse.

La liste des belles rencontres orléanaises serait extrêmement longue, je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai pu rencontrer au CBM.

Je témoigne aussi ma reconnaissance à toute ma famille pour le soutien tant moral que matériel qu'ils m'ont apporté et plus particulièrement au Dr. Kyangwi AKILIMALI mon oncle et mon mentor et sa femme Zaina AMUNDALA. Mjomba, sijue kama ni seme nini sababu ume fanya mingi mu maisha yangu. Ata maman angeli kuaka apa, naye angeli furai sana kuona namna una nifikisha kwa iyi niveau. UME FANYA KAZI KABISA. Mwenyezi Mungu akubariki. Merci au pasteur Hangi MALIKIDOGO, à tate Yalala MWASI, à Hangi AKILIMALI, à Muhima AKILIMALI, à Ndoole AKILIMALI, à Rusoma Blaise AKILIMALI, Julie Zawadi ANTONIO, Esther MULOLWA, Mulolwa, Nzanzu MAHAMBWA, Kambere MALIKI, Heider LUFUKARIBU, Dr. Patrick Kyangwi MALIKIDOGO (II), Annah KANYERE, Muhindo Eric BAILANDA, Thethe AKILIMALI, Aurélie VAN BELLE AKILIMALI, Enriquet, Joel, Roberto, Ma Marie AMUNDALA, Yvette, Yolanda, Prisca, Nana, Lisette, Baba Lydie, Da Vicky, Da Mawazo, Bash Kyangwi MWANZALE, oncle Sumaili, Ma Helene, oncle Malik, Ma Eliza, Aimé, Lydie, Alice, Rosine, etc.,.... Muhima et Aurélie, merci beaucoup pour avoir représenté la famille le jour de ma soutenance.

Un grand merci à la famille Abeso ADA, famille Julie ANTONIO, famille Janvier WA KIBALE, famille Nvumbi MUANDA, famille Fundi KANAMULI, famille MUTONJI, famille GAKOU, famille du pasteur Cléophas MUSULURU, a famille MULOLWA, la famille BOTOWAMUNGU, famille Bernadette KALEBA, famille KALINDA, famille NDUNGU pour leurs conseils.

Merci à mes partenaires, allié(e)s de combat et ami(e)s fidèles Yannick FUNDI NYEMBO AMISI, Pierre Lanto MUANDA, Cedrick ONGA'NTSANG ATISUN, Emma NOMBE KELA, Eric MUTONJI, Daniel NDUNGU, José NOMBE, Sedrick KABWE MUTONJI, Junior Vincent LUMBU, Gislaine MBWELONGO (alias G-Girl), Carine Tambwe MBWELONGO, Fabrice MBWELONGO, Irène DJONGA, Prudence FUNDI NYEMBO (alias la katangaise Capitaine de l'équipe), Rodrigues ILUNGA, Giselle KALEBA, Marlin MIJOSEE (alias Jeune Pato), Jackson KAPONDA (alias Jacko), Gloire NTOYA PANDA, Joan André MBWENO, Patrick MBWENO (Mwana Papa), Leatitia NDUNGU, Olga MAVAKALA, Leatitia MAVAKALA, Klaris KOUAME, Aminda MOLINGA MBOMBA, Flo NDIRIMBA, Jean Marie KASEREKA, Randy, Junior BOMOLO, Adama KEITA, Huguette KISUKA, Ibrahim DOUMOUYA, AK Chris MICHEL, Cynthia, Vanessa, DJ Aristeed, Aline IMANI SHIMWE, Amy, Raissa, Nancy, Gaston NGANGA, Ewing MATUTA, Emmanuelle KABEYA, Armand, Pasco BIANKE, Giselle BONGO, Landry (alias Mick Mack).

Je tiens à remercier mes grands frères et sœurs : Ephraïm NZOKO, LUMBU Christian, DJ MUHOZI Willy, KHONDE Patrick, KHONDE Dhedhe, Alfred (VCC), SANGWA Zoungou ainsi que Da Bernadette (Ma Loulou) et Da Angela KASILEMBO LUMBU, Laure, Patrick KNOBANG pour leurs conseils. Vieux nanga Christian et Ephraïm, botala petit nabino esika akomi.

Un grand merci à Graca KAMOSSI BATEKE et Fatoumata GAKOU pour avoir été là pour moi au début du projet. Je resterai toujours reconnaissant pour ce que vous avez fait pour moi.

Je tiens à remercier une personne spéciale pour moi qui est Edwige KANYERE BAHATI. En tout cas, merci beaucoup pour tout. Name bugha wasinja. Wangu si mina lala !

Une pensée pour terminer ces remerciements pour toi Ma’Rose qui est partie si tôt et qui ne verra pas l’aboutissement de mon rêve d’enfance. Je sais que tu aurais été fière de ton fils !!! J’aurai toujours une pensée pour toi maman. Nakupenda sana.

Abréviations

AIBN	Azobis(isobutyronitrile)
BAPT	Acide 1,2- <i>O</i> -amoniphenoxy- <i>N</i> - <i>N</i> '- <i>N</i> '- <i>N</i> '-tetraacétique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
Cbz	Carboxybenzyle
CEST	Transfert de Saturation par Echange Chimique
COSY	Spectroscopie de corrélation homonucléaire (CORrelation SpectroscopY)
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DFT	Density Functional Theory
DMF	Diméthylformamide
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DO3A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique
DPA	Di-(2-picoly)amine
DTPA	Acide diéthylène triamine pentaacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tetraacétique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSA	Human Serum Albumin
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy
ICP-AES	Spéctrométrie d'émission atomique avec plasma couplé par induction
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
IM	Imagerie Moléculaire
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRMf	Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
IS	Inner-Sphere
Ln(III)	Cations lanthanides(III)
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NMRD	Dispersion de la Relaxation Magnétique Nucléaire
OS	Outre Sphère
PET	Positron Emission Tomography
Py	Pyridine

Abréviations

RF	Radio Fréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAA	Spectroscopie d’Absorption Atomique
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxyde
T. A	Température Ambiante
TEMP	Tomographie par Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Emission de Positron
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
USPIO	Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxyde
UV	Ultra-Violet

« Expliquer toute la nature est une tâche trop ardue pour un seul homme ou une seule époque. Il est plus sage de faire peu en étant sûr de soi et laisser le reste à ceux qui viendront après, que présumer de tout sans être sûr de rien. »

Isaac Newton (1642-1727)

Sommaire

Introduction générale.....	25
-----------------------------------	-----------

Chapitre I : Les lanthanides(III) en imagerie médicale	31
---	-----------

1. Propriétés fondamentales des ions Ln(III).....	35
--	-----------

1.1. Généralités	35
1.2. Propriétés chimiques des Ln(III)	36
1.2.1. Configurations électroniques et degrés d'oxydation	36
1.2.2. Caractérisations stériques, géométriques et coordination	37
1.3. Propriétés magnétiques et spectroscopiques des Ln(III)	39
1.3.1. Propriétés spectroscopiques	39
1.3.2. Propriétés magnétiques	43
1.4. Toxicité des Ln(III)	45

2. Complexes de Gd(III) comme agents de contraste pour l'IRM....	45
---	-----------

2.1. L'IRM : généralités	45
2.1.1. Principe	45
2.1.2. Agents de contraste T1 et T2	48
2.2. Mécanismes de relaxivité des complexes Gd(III)	51
2.3. Paramètres influençant le mécanisme de sphère interne	53
2.4. Stabilité des agents de contraste à base de Gd(III)	56
2.4.1. Stabilité thermodynamiques des complexes de Gd(III)	56
2.4.2. Cinétique de dissociation des complexes de Gd(III)	57

3. Imagerie moléculaire : développement d'agents de contraste IRM responsifs.....	58
3.1. Mécanisme de la bioactivation	59
3.1.1.Principe et paramètres à détecter	59
3.1.2.Quelques exemples	61
3.2. Détection des cations métalliques	66
3.2.1.Sondes responsives aux cations Ca(II) et Cu(II)	67
3.2.2.Détection du Zn(II)	73
3.3. Quantification des paramètres physiologiques	83
3.3.1.Problématique	83
3.3.2.Méthodes utilisées	83
4. Objectif de la thèse.....	86
5. Bibliographie.....	88

Chapitre II : Détection du Zn(II) par des complexes de Gd(III) à base de pyridine : Optimisation de la stabilité et de la réponse au Zn(II)97

1. Introduction.....	101
2. Synthèse des ligands L1, L2, L3A et L3B.....	102
2.1. Synthèse du ligand L1	102
2.1.1.Synthèse par la voie A	103
2.1.2.Synthèse par la voie B	107

2.1.3.	Conclusion sur les voies de synthèse du ligand L1	109
2.2.	Synthèse du ligand L2	109
2.2.1.	Approche par rétrosynthèse	109
2.2.2.	Synthèse par substitutions nucléophiles successives	110
2.3.	Synthèse des ligands modèles L3A et L3B	111
3.	Caractérisation des complexes de lanthanides LnL1 et LnL2..	113
3.1.	Propriétés thermodynamiques	113
3.1.1.	Constantes de protonation	113
3.1.2.	Constantes de stabilité	115
3.2.	Propriétés magnétiques (Profil NMRD)	120
4.	Etude de l'influence du Zn(II) sur les propriétés relaxométriques de LnL1 et LnL2.....	122
4.1.	Influence du Zn(II) sur la relaxivité	122
4.2.	Mesures de temps de vie de luminescence	124
4.3.	Influence du groupement chélatant du Zn(II) sur la relaxivité	125
5.	Détection de Zn(II) en présence de HSA.....	126
5.1.	Introduction sur la HSA	126
5.2.	Relaxivité en présence de HSA	128
5.3.	Affinité des complexes pour la HSA	129
5.4.	Analyse des courbes NMRD	133
5.4.1.	Détermination de q	133
5.4.2.	Fits par l'approche Lipari-Szabo	133
5.5.	Sélectivité par rapport aux cations biologiques	135

6.	Conclusions et perspectives.....	137
----	----------------------------------	-----

7.	Bibliographie.....	138
----	--------------------	-----

Chapitre III : Etude structurale de la réponse au Zn(II) par variation de τ_R en présence de HSA..... 141

1.	Introduction.....	144
----	-------------------	-----

2.	Synthèse et études du ligand L4.....	145
----	--------------------------------------	-----

2.1.	Synthèse du ligand L4	145
------	-----------------------	-----

2.1.1.	1ère stratégie de synthèse	145
--------	----------------------------	-----

2.1.2.	2ème stratégie de synthèse	150
--------	----------------------------	-----

2.1.3.	Adaptation de la 2ème stratégie de synthèse	152
--------	---	-----

2.2.	Etude de la réponse de GdL4 au Zn(II)	154
------	---------------------------------------	-----

2.2.1.	Etude de la stoechiométrie des complexes LnL4	154
--------	---	-----

2.2.2.	Détection du Zn(II) par relaxométrie	155
--------	--------------------------------------	-----

3.	Synthèse de L5.....	157
----	---------------------	-----

4.	Optimisation de la réponse aux cations métalliques en présence de HSA.....	158
----	--	-----

4.1.	Etude de l'affinité des complexes pour la HSA	158
------	---	-----

4.2.	Etude des Profils NMRD	161
------	------------------------	-----

5.	Conclusions et perspectives.....	167
----	----------------------------------	-----

6. Bibliographie.....	169
------------------------------	------------

Chapitre IV : Détection du Zn(II) par variation de q.....	171
---	------------

1. Introduction.....	174
-----------------------------	------------

2. Synthèse des ligands L6 et L7	176
---	------------

3. Etude des complexes formés avec L7	177
--	------------

3.1. Détermination de la stoechiométrie des complexes Ln(III)/L7	177
---	------------

3.2. Etude de la complexation de LnL7 par Zn(II)	178
---	------------

3.2.1. Etude par luminescence	178
-------------------------------	-----

3.2.2. Influence du Zn(II) sur la relaxivité de LnL7	181
--	-----

3.2.3. Profils NMRD	182
---------------------	-----

3.2.4. Sélectivité	183
--------------------	-----

4. Etude des complexes formés avec L6	184
--	------------

4.1. Détermination de la stoechiométrie des complexes Ln(III)/L6	184
---	------------

4.2. Etude de la complexation de LnL6 par Zn(II)	185
---	------------

4.2.1. Etude par luminescence	185
-------------------------------	-----

4.2.2. Influence du Zn(II) sur la relaxivité de LnL6	187
--	-----

4.2.3. Profils NMRD	190
---------------------	-----

4.2.4. Sélectivité	191
--------------------	-----

5. Conclusions et perspectives.....	192
--	------------

6.	Bibliographie.....	194
----	--------------------	-----

Chapitre V : Utilisation de sondes bimodales IRM/imagerie nucléaire : Vers la quantification du Zn(II) in vitro..... 195

1.	Introduction.....	199
----	-------------------	-----

2.	Tomographie par Emission MonoPhotonique.....	200
----	--	-----

2.1.	Principe	200
------	----------	-----

2.2.	Choix du lanthanide radioactif	202
------	--------------------------------	-----

3.	Production, purification, détection par Nano SPECT/CT et complexation.....	204
----	---	-----

3.1.	Production	204
------	------------	-----

3.2.	Purification	206
------	--------------	-----

3.3.	Détection par Nano SPECT/CT	207
------	-----------------------------	-----

3.4.	Complexation de l' ¹⁶⁵ Er(III)	208
------	---	-----

4.	Principe et quantification du Zn(II).....	209
----	---	-----

4.1.	Principe de la quantification	209
------	-------------------------------	-----

4.2.	Quantification du Zn(II)	210
------	--------------------------	-----

5.	Conclusions et perspectives.....	213
----	----------------------------------	-----

6.	Bibliographie.....	215
----	--------------------	-----

Conclusions générale et perspectives.....	217
Partie expérimentale.....	225
Annexes.....	287

Introduction générale

L'évolution de la technologie a permis de grandes avancées dans la médecine moderne et plus particulièrement dans le domaine de l'imagerie médicale. Ce terme regroupe l'ensemble des techniques permettant d'obtenir des images du corps humain à partir de différents phénomènes physiques à des fins de diagnostic, de thérapeutique ou de surveillance de l'évolution des pathologies. Au-delà de l'examen clinique, elle permet aujourd'hui une exploration du vivant et une amélioration des connaissances en biologie moléculaire et cellulaire.

Différentes techniques d'imagerie médicale ont été développées et chacune avec ses propres avantages et inconvénients. Parmi elles, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est devenue au cours des dernières années une technique incontournable dans le domaine du diagnostic médical moderne. Non invasive, elle est basée sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN). Ce concept a été découvert en 1946 par Felix Bloch de l'Université de Stanford et Edward Purcell de l'Université de Harvard et leur a valu un prix Nobel en physique en 1952. Le phénomène de la RMN est donc connu depuis longtemps. Cependant, l'IRM ne livre ses premières images qu'en 1973 et fait son apparition dans le milieu hospitalier une dizaine d'années plus tard en donnant dans un premier temps des informations anatomiques. On parle alors de l'IRM structurelle. Par la suite, elle donne accès au fonctionnement de différents organes (IRM fonctionnelle ou IRMf). Grâce à cette avancée mise en œuvre par Seiji Ogawa, John Belliveau et Pierre Bandettini, les zones du cerveau impliquées dans différentes activités ont été mises en évidence via une observation en temps réel des variations de l'oxygénation du sang lors de l'étude du fonctionnement du cerveau (**Figure 1**).

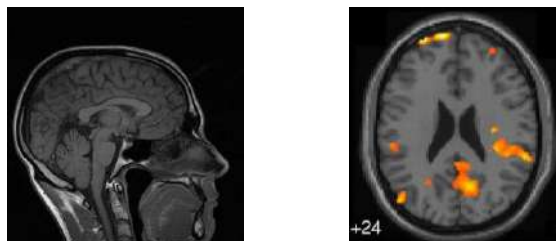


Figure 1 : Image IRM anatomique d'une coupe de cerveau (à gauche) (adapté de : <https://en.wikipedia.org/wiki/>) et réponse à un stimulus lumineux observée en IRM fonctionnelle (à droite)[1].

Aujourd'hui, elle permet d'aller visualiser les événements moléculaires se produisant au niveau cellulaire. On parle ainsi de l'imagerie moléculaire (IM). Contrairement à l'IRM traditionnelle, l'imagerie moléculaire nécessite l'utilisation d'une sonde spécifique pour l'événement que l'on cherche à visualiser. Ainsi, les agents de contraste à base de gadolinium(III) ont montré leur intérêt pour la détection de paramètres physiologiques se produisant dans l'organisme.

D'autres techniques d'imagerie, telles que la Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP) et la Tomographie par Emission de Positron (TEP) utilisent des agents radiopharmaceutiques qui sont des molécules contenant un élément radioactif fixé soit directement sur la molécule, soit sous forme de complexe. Ces produits radioactifs sont composés de molécules qui possèdent une affinité pour une cible bien spécifique (tissu, organe...). Ces techniques ont une sensibilité excellente (pM) [2] et leur principe d'action est basé sur la mesure de la radioactivité d'un traceur avec l'émission de rayons gamma (TEMP) ou avec l'émission de positron (TEP).

Ces techniques peuvent être complémentaires les unes des autres. Par exemple, les premières expériences cliniques combinant IRM et TEP ont montré que cette méthode d'imagerie très sophistiquée possède un grand potentiel pour améliorer le diagnostic non invasif de différentes maladies (**Figure 2**).

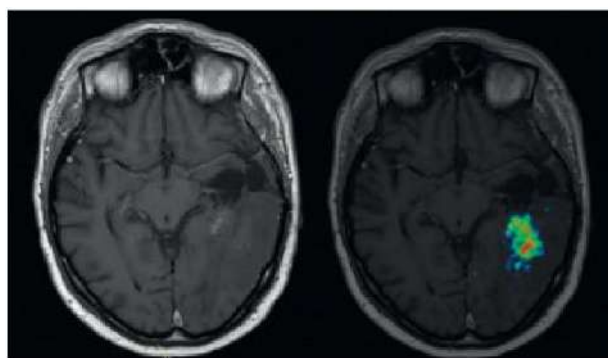


Figure 2. (Gauche) IRM avec produit de contraste (gadolinium). (Droite) Fusion avec la TEP à l'éthyl-tyrosine marquée au ^{18}F spécifique pour les tissus tumoraux au niveau cérébral[3].

Dans ce travail, nous allons voir comment les lanthanides(III), grâce à leurs propriétés, jouent un rôle important en imagerie médicale. Ils sont par exemple utilisés en imagerie optique, en particulier grâce à leurs propriétés d'émission dans le visible et dans le proche infra-rouge. En IRM, le gadolinium(III) est utilisé actuellement en clinique comme agent de contraste sous forme de complexes stables. Aujourd'hui, la compréhension des pathologies mais aussi la prévention de celles-ci a conduit à la conception de nouveaux agents de contraste responsifs répondant à des paramètres physico-chimiques comme le pH, la température, les processus enzymatiques, les ions etc, ... Ces recherches, encore à l'état de recherche fondamentale ou biomédicale, sont prometteuses car les changements de ces paramètres peuvent indiquer la présence d'une maladie à ses premiers stades.

Nous verrons également comment la nouvelle technologie de l'imagerie moderne, notamment le couplage IRM-imagerie nucléaire peut conduire à la détection quantitative de ces paramètres et plus particulièrement à la quantification de Zn(II) qui est impliqué dans plusieurs pathologies. Ici, nous apporterons une preuve de concept de la détection quantitative de Zn(II) par IRM-TEMP *in vitro*.

-
1. Christoff, K.; Gordon, A.M.; Smallwood, J.; Smith, R.; Schooler, J.W. Experience sampling during fMRI reveals default network and executive system contributions to mind wandering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8719-8724.
 2. Ramogida, C.F.; Orvig, C. Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4720-4739.
 3. Kuhn, F.P. TEP/IRM: l'imagerie hybride de l'avenir. *Forum Med Suisse* **2012**, *12*, 11-12.

Chapitre I

Les lanthanides(III) en imagerie médicale

Table des matières

1. Propriétés fondamentales des ions Ln(III)	35
1.1. Généralités.....	35
1.2. Propriétés chimiques des Ln(III).....	36
1.2.1. Configurations électroniques et degrés d'oxydation.....	36
1.2.2. Caractérisations stériques, géométriques et coordination.....	37
1.3. Propriétés magnétiques et spectroscopiques des Ln(III).....	39
1.3.1. Propriétés spectroscopiques	39
1.3.2. Propriétés magnétiques.....	43
1.4. Toxicité des Ln(III).....	45
2. Complexes de Gd(III) comme agents de contraste pour l'IRM.....	45
2.1. L'IRM : généralités.....	45
2.1.1. Principe	45
2.1.2. Agents de contraste T ₁ et T ₂	48
2.2. Mécanismes de relaxivité des complexes Gd(III).....	51
2.3. Paramètres influençant le mécanisme de sphère interne	53
2.4. Stabilité des agents de contraste à base de Gd(III).....	56
2.4.1. Stabilité thermodynamiques des complexes de Gd(III)	56
2.4.2. Cinétique de dissociation des complexes de Gd(III).....	57
3. Imagerie moléculaire : développement d'agents de contraste IRM responsifs.....	58

3.1. Mécanisme de la bioactivation	59
3.1.1. Principe et paramètres à détecter	59
3.1.2. Quelques exemples	61
3.2. Détection des cations métalliques.....	66
3.2.1. Sondes responsives aux cations Ca(II) et Cu(II)	67
3.2.2. Détection du Zn(II)	73
3.3. Quantification des paramètres physiologiques.....	83
3.3.1. Problématique	83
3.3.2. Méthodes utilisées	83
 4. Objectif de la thèse.....	 86
 5. Bibliographie.....	 88

1. Propriétés fondamentales des ions Ln(III)

1.1. Généralités

Les lanthanides désignent les éléments de la 6^{ème} période du tableau périodique de Mendeleïev et constituent le premier groupe d'atomes du bloc *f* (**Figure I. 1**). Ils regroupent 15 éléments allant du lanthane (La, Z = 57) au lutétium (Lu, Z = 71) et ils complètent avec le Scandium (Sc, Z = 21) et l'Yttrium (Y, Z = 39) la famille des « terres-rares ». Contrairement à cette appellation, ces métaux ne sont pas rares, ils sont abondants sous forme d'oxyde dans la croûte terrestre [1]. Cette dénomination est historiquement associée aux difficultés de séparation qui entourent leur exploitation.

1																		2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
H hydrogen (1.007, 1.008)																		He helium 4.003																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
3 Li lithium (6.938, 6.961)																		4 Be beryllium 9.012																		5 B boron (10.81, 10.82)																		6 C carbon (12.01, 12.01)																		7 N nitrogen (14.01, 14.01)																		8 O oxygen (15.99, 16.00)																		9 F fluorine 18.99																		10 Ne neon 20.18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
11 Na sodium 22.99																		12 Mg magnesium 24.31																		13 Al aluminium 26.98																		14 Si silicon (28.08, 28.09)																		15 P phosphorus 30.97																		16 S sulfur (32.06, 32.07)																		17 Cl chlorine (35.45, 35.46)																		18 Ar argon 39.95																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
19 K potassium 39.10																		20 Ca calcium 40.08																		21 Sc scandium 44.96																		22 Ti titanium 47.87																		23 V vanadium 50.94																		24 Cr chromium 52.00																		25 Mn manganese 54.94																		26 Fe iron 55.85																		27 Co cobalt 58.93																		28 Ni nickel 58.69																		29 Cu copper 63.55																		30 Zn zinc (65.38, 65.39)																		31 Ga gallium 69.72																		32 Ge germanium 72.63																		33 As arsenic 74.92																		34 Se selenium 78.96																		35 Br bromine 79.90																		36 Kr krypton 83.80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
37 Rb rubidium 85.47																		38 Sr strontium 87.62																		39 Y yttrium 88.91																		40 Zr zirconium 91.22																		41 Nb niobium 92.91																		42 Mo molybdenum 95.94																		43 Tc technetium 98.91																		44 Ru ruthenium 101.1																		45 Rh rhodium 102.9																		46 Pd palladium 106.4																		47 Ag silver 107.9																		48 Cd cadmium 112.4																		49 In indium 114.8																		50 Sn tin 118.7																		51 Sb antimony 121.8																		52 Te tellurium 127.6																		53 I iodine 126.9																		54 Xe xenon 131.3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
55 Cs caesium 132.9																		56 Ba barium 137.3																		57-71 lanthanoids																		72 Hf hafnium 178.5																		73 Ta tantalum 180.9																		74 W tungsten 183.8																		75 Re rhenium 186.2																		76 Os osmium 190.2																		77 Ir iridium 192.2																		78 Pt platinum 195.1																		79 Au gold 197.0																		80 Hg mercury 200.6																		81 Tl thallium (204.3, 204.4)																		82 Pb lead 207.2																		83 Bi bismuth 209.0																		84 Po polonium																		85 At astatine																		86 Rn radon																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
87 Fr francium																		88 Ra radium																		89-103 actinoids																		104 Rf rutherfordium																		105 Db dubnium																		106 Sg seaborgium																		107 Bh bohrium																		108 Hs hassium																		109 Mt meitnerium																		110 Ds darmstadtium																		111 Rg roentgenium																		112 Cn copernicium																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

Figure I. 1 : Tableau périodique de Mendeleïev (la famille des lanthanides est représentée en vert).

Depuis longtemps, la similarité de propriétés chimiques entre les lanthanides a conduit à la difficulté de les séparer les uns des autres dans les minerais naturels et d'autres mélanges. Néanmoins, l'évolution de la technologie en chimie de séparation telles que la chromatographie et l'extraction permettent aujourd'hui de les séparer [2].

Leur remarquable homogénéité de propriétés physico-chimiques fait toute leur richesse et ils sont utilisés dans les domaines variés des hautes technologies, qui elles-mêmes connaissent un développement accentué et pour lesquelles nous devenons de plus en plus dépendants.

1.2. Propriétés chimiques des Ln(III)

1.2.1. Configurations électroniques et degrés d'oxydation

Les lanthanides sont construits par un remplissage progressif de l'orbitale $4f$ et leur configuration électronique générale à l'état atomique est la suivante : $[\text{Xe}] 6s^2 5d^i 4f^n$ avec n compris entre 0 et 14 et $i = 0$ ou 1. En réalité, les électrons de l'orbitale $4f$ sont plus proches du noyau que les électrons des orbitales $5s$, $5p$ et $6s$. Par conséquent, ils se trouvent protégés des perturbations par ces couches externes. Ils sont donc peu influencés par l'environnement chimique et la formation d'une liaison chimique par interaction covalente impliquant des électrons $4f$ est impossible.

Les terres rares sont très électropositives et leur chimie est largement dominée par le degré d'oxydation +III qui est le degré d'oxydation le plus stable pour l'ensemble de la série. Ils présentent alors une configuration électronique $[\text{Xe}] 6s^0 4f^n 5d^0$. Ils deviennent ainsi trivalents et sont notés Ln(III). Sous certaines conditions, d'autres états d'oxydation (+II ou +IV) peuvent parfois être observés pour le cérium [3], l'euprimum [4], le terbium [5] ainsi que le samarium [6]. Les configurations électroniques de chacun des lanthanides et de leurs ions trivalents associés sont données dans le **tableau I. 1**.

Le remplissage progressif de la sous couche $4f$ du La au Lu entraîne une diminution du rayon ionique de 19 % en coordinance 9 (**Tableau I. 1**). En effet, en raison de l'écrantage imparfait, la charge nucléaire agit davantage sur les électrons périphériques. Par conséquent, le numéro atomique augmente de sorte que le rayon des atomes et des ions Ln(III) diminue du lanthane au lutécium. On assiste alors à la contraction des orbitales $5s$ et $5p$. On parle ainsi du phénomène de contraction des lanthanides.

Tableau I. 1 : Configuration électronique et rayon ionique des lanthanides et de leurs ions (Avec [Xe] = $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^{10} 4p^6 5s^2 4d^{10} 5p^6$)

Elément chimique			Configuration électronique		Rayon ionique [7]
Nom	Numéro atomique	Symbole chimique	Ln	Ln(III)	Ln(III) CN = 9
Lanthane	57	La	[Xe] $5d^1 6s^2$	[Xe] $4f^0$	1,216
Cérium	58	Ce	[Xe] $5d^1 6s^2 4f^1$	[Xe] $4f^1$	1,196
Praséodyme	59	Pr	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^3$	[Xe] $4f^2$	1,179
Néodyme	60	Nd	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^4$	[Xe] $4f^3$	1,163
Prométhium	61	Pm	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^5$	[Xe] $4f^4$	-
Samarium	62	Sm	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^6$	[Xe] $4f^5$	1,132
Europium	63	Eu	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^7$	[Xe] $4f^6$	1,120
Gadolinium	64	Gd	[Xe] $5d^1 6s^2 4f^7$	[Xe] $4f^7$	1,107
Terbium	65	Tb	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^9$	[Xe] $4f^8$	1,095
Dysprosium	66	Dy	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^{10}$	[Xe] $4f^9$	1,083
Holmium	67	Ho	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^{11}$	[Xe] $4f^{10}$	1,072
Erbium	68	Er	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^{12}$	[Xe] $4f^{11}$	1,062
Thulium	69	Tm	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^{13}$	[Xe] $4f^{12}$	1,052
Ytterbium	70	Yb	[Xe] $5d^0 6s^2 4f^{14}$	[Xe] $4f^{13}$	1,042
Lutécium	71	Lu	[Xe] $5d^1 6s^2 4f^{14}$	[Xe] $4f^{14}$	1,032

Ce phénomène gouverne la variation du rayon ionique des Ln(III). Celui-ci influence la géométrie de coordination, la réactivité ainsi que la formation des complexes des Ln(III).

1.2.2. Caractérisations stériques, géométriques et coordination

Les Ln(III) possèdent une couche électronique externe $5s^2 5p^6$ complète. Ces cations sont donc peu polarisables et ne peuvent pas former de liaisons covalentes. Ils forment donc essentiellement des complexes grâce à des interactions de type électrostatiques. Par ailleurs, les ions Ln(III) étant des acides durs dans la classification de Pearson [8], d'un point de vue électrostatique, ces ions vont accommoder un grand nombre d'atomes

donneurs d'électrons tels que l'atome d'oxygène et d'azote, de façon à minimiser l'énergie électrostatique. Ainsi, les ligands avec des groupes donneurs contenant l'atome d'oxygène chargé négativement tels que le carboxylate, le sulfonate, le phosphonate et le phosphinate etc., ... peuvent alors se lier d'une manière efficace à Ln(III) .

Pour les Ln(III) , le champ des ligands n'impose pas de contrainte géométrique aux orbitales des ions contrairement aux cations métalliques du bloc *d*. Par conséquent, il en résulte une absence de géométrie de coordination privilégiée au sein de leurs complexes. Les nombres de coordination ainsi que les géométries associées sont conditionnés essentiellement par les interactions électrostatiques et stériques entre le cation métallique et les ligands [9], [10]. D'un autre côté, minimiser les contraintes stériques est également très important et un ligand multidentate donné peut imposer une coordination particulière autour de l'ion.

Les ions Ln(III) présentent des nombres de coordination communs allant de 6 à 12, les plus fréquents étant 8 et 9. En solution aqueuse, les molécules d'eau et les ions hydroxydes complexent fortement les Ln(III) . En outre, la forte acidité de Ln(III) au sens de Lewis conduit également à l'activation des protons des molécules d'eau coordonnées au cation métallique, conduisant à la formation, à partir d'un pH de 6.5 environ, d'hydroxocomplexes de Ln(III) insolubles Ln(OH)_3 .

Les propriétés électroniques uniques des ions Ln(III) conduisent à des propriétés spectroscopiques et magnétiques remarquables donnant ainsi à ces cations une large gamme d'applications.

1.3. Propriétés magnétiques et spectroscopiques des Ln(III)

1.3.1. Propriétés spectroscopiques

1.3.1.1. Luminescence de Ln(III)

➤ Niveaux d'énergie

Les ions Ln(III), à l'exception du La(III) et du Lu(III), possèdent des propriétés spectrales uniques dues aux transitions $f-f$ dans la sous-couche $4f$. Les électrons de ces sous-couches peuvent être décrits par :

- le nombre quantique primaire $n = 4$
- le nombre quantique secondaire $l = 3$
- le nombre quantique magnétique m_l ($-l \leq m_l \leq +l$)
- et le nombre quantique de spin $m_s = \pm \frac{1}{2}$

Les ions libres étant peu perturbés par le champ cristallin, il est alors possible de décrire leurs niveaux d'énergie en ne tenant compte que de la répulsion électronique et des couplages spin-orbite. Ces paramètres peuvent être calculés à partir de la multiplicité de spin S des cations, de leur moment angulaire L et de leur moment cinétique global $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$, avec $|L-S| \leq J \leq |L+S|$. Les différents niveaux d'énergie possibles dans le cas de l'Eu(III) sont représentés en haut sur la **figure I. 2**.

➤ Mécanismes de Luminescence des ions Ln(III)

A l'exception du La(III) $4f^0$ et du Lu(III) $4f^{14}$, les lanthanides trivalents possèdent des propriétés singulières de luminescence qui recouvrent une large gamme spectrale allant de l'UV (Gd(III)) au visible (Pr(III), Sm(III), Eu(III), Tb(III), Dy(III) et Tm(III)) et au proche infra-rouge (Pr(III), Nd(III), Ho(III), Er(III) et Yb(III)). Le spectre caractéristique des différents ions Ln(III) est représenté en bas sur la **figure I. 2**.

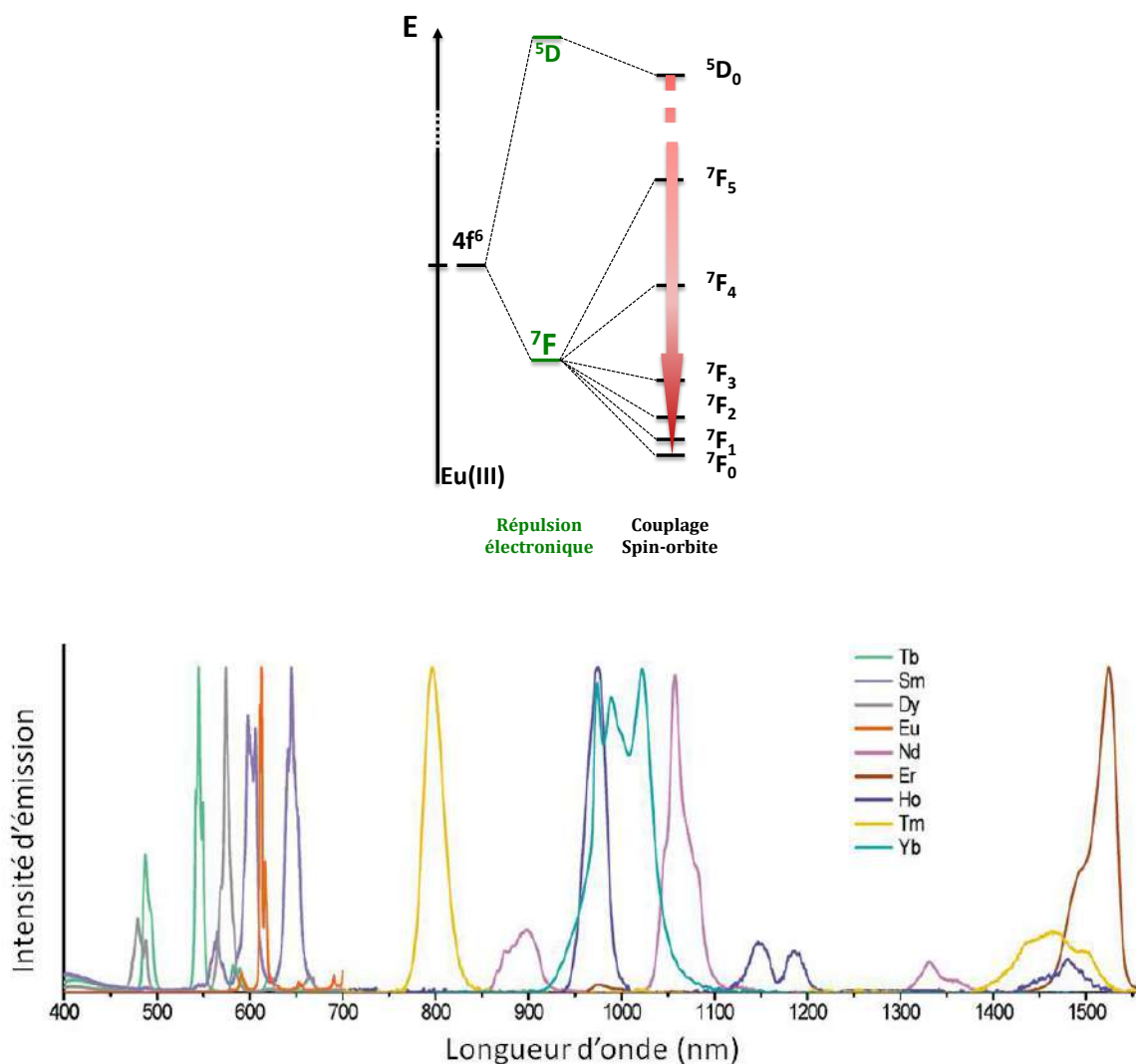


Figure I. 2: En haut, représentation des niveaux électroniques $^{2S+1}L_J$ des Ln(III) dans le cas de l'Eu(III) [11]. En bas, les spectres d'émission normalisés de complexes de Ln(III) luminescents en solution [12].

Comme indiqué précédemment, les transitions électroniques ont lieu entre les électrons écrantés de la sous-couche $4f$ et déterminent les propriétés optiques particulières des ions Ln(III). En effet, ces transitions font intervenir des orbitales de même symétrie, elles sont donc interdites par la règle de sélection de Laporte ou règle de parité. Le retour à l'état fondamental des ions excités est un processus défavorisé, ce qui donne aux états excités des temps de vie de luminescence très longs pour certains Ln(III) (de l'ordre de la milliseconde pour les ions Eu(III) et Tb(III)). En outre, les électrons $4f$ qui interviennent dans la luminescence des ions Ln(III) sont proches du noyau et n'interagissent pas avec les orbitales moléculaires du ligand. Ils sont très peu perturbés

par l'environnement et produisent en retournant à l'état fondamental des raies d'émissions fines et caractéristiques pour chacun des ions en fonction des niveaux d'énergie impliqués (**Figure I. 2**). Cependant, l'accès à la luminescence des Ln(III) dont les coefficients d'extinction molaire sont très faibles (inférieurs à $3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) [13] via une excitation directe est délicat. Le peuplement des états excités des ions Ln(III) par excitation directe nécessite l'utilisation de sources d'énergie puissantes telles que les LASERS. D'un point de vue pratique, ceci est peu utilisable, en particulier pour l'imagerie. Une alternative consiste à sensibiliser indirectement les ions Ln(III) via une molécule organique appelée antenne et ce phénomène est appelé effet d'antenne (**Figure I. 3**).

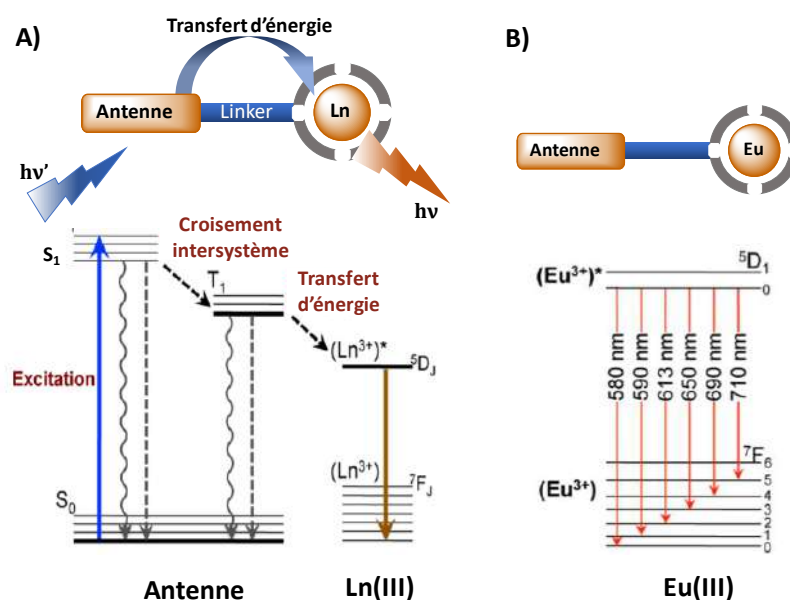


Figure I. 3 : (A) Effet d'antenne [14], [15], [16], [17]. L'architecture générale des complexes de Ln(III) émissifs consiste en un centre en métal entouré d'un chélatant et équipé d'un sensibilisateur ou d'une antenne. (B) Transitions luminescentes 4f-4f des complexes d'eupruium et des longueurs d'onde d'émission généralement observées pour émettre de la lumière rouge.

Certains chromophores organiques conjugués à haut coefficients d'absorption molaire sont susceptibles de collecter des photons lorsqu'ils sont irradiés, ensuite de les transférer à des ions Ln(III) lorsqu'ils sont suffisamment proches dans l'espace et ont des niveaux d'énergie adaptés.

Dans ce processus, le ligand absorbe un photon. Cette absorption peut se faire soit dans l'UV soit dans le visible selon l'étendue du système conjugué et la nature des substituants des dérivés aromatiques. Elle se traduit par le passage de la molécule de son état fondamental S_0 à un état excité plus haut en énergie S_1 . Il est également possible d'observer des transitions de type $S_0 \rightarrow S_2$, mais grâce à des phénomènes de conversion la molécule excitée retourne rapidement à l'état S_1 .

À partir de cet état il existe en général plusieurs chemins de désexcitation radiatifs ou non-radiatifs du ligand. On peut observer la luminescence du ligand à travers l'émission d'un photon lors du retour à l'état fondamental S_0 . Cependant la transition $S_1 \rightarrow S_0$ peut également se produire de manière non-radiative par conversion interne. Par ailleurs, les composés organiques coordonnés aux Ln(III) peuvent passer de leur état singulet S_0 à un état triplet T_1 plus faible en énergie lors d'un croisement intersystème. Ce processus implique une conversion de spin et peut être facilité par effet d'atome lourd. Lorsque les niveaux d'énergies du ligand et la distance entre le chromophore et l'ion Ln(III) sont en adéquation, il peut se produire un transfert d'énergie de T_1 vers les niveaux d'énergie luminescents des ions Ln(III). Le cation est alors dans un état excité et son retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de photons (**Figure I. 3**). Ce phénomène est le plus observé dans le cas des propriétés de luminescences des complexes de Ln(III). Toutefois, il existe de nombreuses autres voies de désexcitation compétitives susceptibles en fonction de la nature du système d'amoindrir l'efficacité de ce processus notamment, le transfert de charge (Charge Transfert CT), transfert d'électron (Electron Transfert ET), etc.,...

Il est également important de noter que l'intensité d'émission de luminescence, le temps de vie de luminescence des états excités de Ln(III) ainsi que d'autres propriétés de luminescence peuvent être dégradés par la présence d'une ou plusieurs molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination du cation métallique. Le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au Ln(III) est appelé nombre d'hydratation.

1.3.1.2. Processus de quenching et nombre d'hydratation des Ln(III)

Lorsque des molécules d'eau sont coordonnées au centre métallique, leurs modes vibrationnels peuvent interagir avec les niveaux électroniques excités de l'ion (5D_0 pour Eu(III) et 5D_4 pour Tb(III)), conduisant à un « quenching » de la luminescence [18].

Ce nombre est un paramètre important à caractériser lors de l'étude de complexes de Ln(III) qu'ils soient luminescents ou magnétiques (voir plus loin). La luminescence des Ln(III) peut donc être un moyen intéressant pour accéder à leur nombre d'hydratation.

Plusieurs scientifiques se sont penchés sur cette problématique et ont proposé une équation empirique permettant de calculer le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au Ln(III) en fonction du temps de vie de luminescence de ces derniers dans différents solvants (**Equation I.1**) [19], [20].

$$q = A_{Ln} \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - B_{Ln} \right) \quad \text{I.1.}$$

où τ représente le temps de vie de luminescence du complexe dans H_2O ou D_2O et A_{Ln} et B_{Ln} sont des constantes de proportionnalité spécifique de chaque Ln(III). Ces constantes sont présentées dans le **tableau I. 2** pour l'euprium.

Tableau I. 2 : Valeur des constantes A et B pour l'euprium

	Valeur selon Horrocks Jr.[19]	Valeur selon Parker [21]
$A_{Eu(III)}$	1.11	1.2
$B_{Eu(III)}$	0.31	0.25

1.3.2. Propriétés magnétiques

Les ions Ln(III) possèdent au moins un électron $4f$ non apparié à l'exception du Lanthane et Lutécium. Ils présentent donc les propriétés paramagnétiques intéressantes puisqu'elles ne sont pas affectées par leur environnement. A partir des trois nombres quantiques S, L et J, le moment magnétique μ_J de chaque Ln(III) peut être calculé selon les équations (**I. 2**) et (**I.3**) [22].

$$\mu_J = g_J \sqrt{J(J+1)} \quad \text{I.2.}$$

$$g_J = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad \text{I.3.}$$

Chaque ion Ln(III) a un moment magnétique caractéristique. Les moments magnétiques expérimentaux des différents cations sont présentés ci-dessous (**Tableau I. 3**). Le prométhéum est radioactif (produit de fission de l'uranium) et ne possède pas d'isotope stable ce qui rend sa caractérisation difficile.

Tableau I. 3 : Moment magnétiques expérimentaux des Ln(III)

Ion Ln(III)	Moment magnétique μ_J [23]
Ce³⁺	2,46
Pr³⁺	3,47
Nd³⁺	3,52
Pm³⁺	-
Sm³⁺	1,58
Eu³⁺	3,54
Gd³⁺	7,90
Tb³⁺	9,60
Dy³⁺	10,30
Ho³⁺	10,40
Er³⁺	9,40
Tm³⁺	7,00
Yb³⁺	4,30

Avec 7 électrons non appariés ($S = 7/2$), le Gd(III) est le cation Ln(III) le plus paramagnétique. De plus, il a un temps de relaxation électronique long ($T_{1e} \sim 10^{-9}$ s) comparé à d'autres Ln(III) paramagnétiques ($T_{1e} \sim 10^{-13}$ pour Eu(III), Yb(III) et Dy(III)). Grâce à leurs propriétés spectroscopiques et magnétiques, les Ln(III) ont de nombreuses applications, en particulier dans le domaine médical et l'imagerie. Cependant, à cause de

la haute toxicité, ces ions ne peuvent être utilisés sous forme libre pour des applications biologiques.

1.4. Toxicité des Ln(III)

La similarité de taille entre les Ln(III) et le Ca(II) fait que ces ions se substituent au Ca(II) en milieu biologique, bloquant notamment les transmissions neuromusculaires en bouchant les canaux du Ca(II).

Parmi ces ions, le Gd(III) est connu pour interagir avec les protéines contenues dans le sérum et se déposer sous forme de sels insolubles sur les os, le foie ainsi que la rate. Il est donc indispensable de l'utiliser sous forme complexée pour les applications en IRM par exemple.

2. Complexes de Gd(III) comme agents de contraste pour l'IRM

L'IRM est une technique d'imagerie non-invasive ayant une excellente résolution spatiale. Elle est basée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et permet d'observer les protons des molécules d'eau contenues dans le corps humain. Son principal défaut reste sa faible sensibilité et il peut être nécessaire dans certains cas d'utiliser un agent de contraste pour améliorer la qualité de l'image IRM.

2.1. L'IRM : généralités

2.1.1. Principe

L'IRM repose sur la propriété magnétique du noyau des atomes d'hydrogène (protons) des molécules d'eau en réponse à des impulsions radiofréquences (RF). En pratique, lorsqu'un corps est placé dans un champ magnétique stationnaire d'intensité B_0 , les spins nucléaires d'hydrogène des molécules d'eau abondantes dans les tissus qui étaient auparavant orientés de façon aléatoire (**Figure I. 4A**) s'organisent et s'orientent dans une direction parallèle à $\vec{B}_0$ (**Figure I. 4B**). Cette position est considérée comme l'équilibre. En réalité, les spins ne sont pas parfaitement alignés selon $\vec{B}_0$ (Oz) mais

précessent individuellement autour de $\vec{B}_0$ à une fréquence ϑ_0 appelée fréquence de Larmor (**Equation 1.4**).

$$\vartheta_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad \text{I.4.}$$

où γ , ϑ_0 et B_0 représentent respectivement le rapport gyromagnétique qui dépend de la nature du noyau, la fréquence de précession du noyau et le champ magnétique stationnaire.

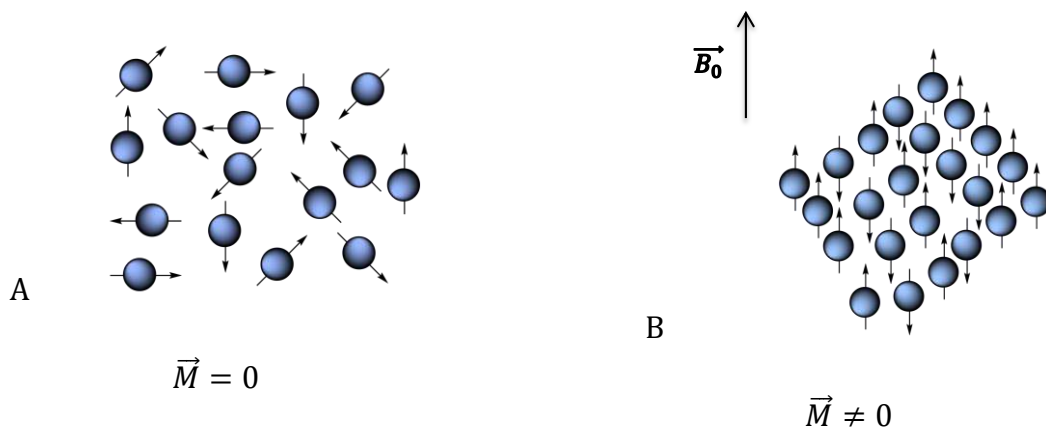


Figure I. 4 : Comportement des spins des protons A) en absence d'un champ magnétique externe et B) soumis à un champ magnétique extérieur B_0 .

Un vecteur d'aimantation macroscopique $\vec{M}$ apparaît et décrit la position du spin résultant. Sous l'effet d'impulsion radiofréquence B_1 , cet état d'équilibre est perturbé. Ainsi, le vecteur de magnétisation $\vec{M}$ bascule (90°) dans le plan Oxy avec apparition d'une nouvelle composante M_{xy} appelée composante transversale et M_z longitudinale (**Figure I. 5**). Cela engendre un phénomène de résonance.

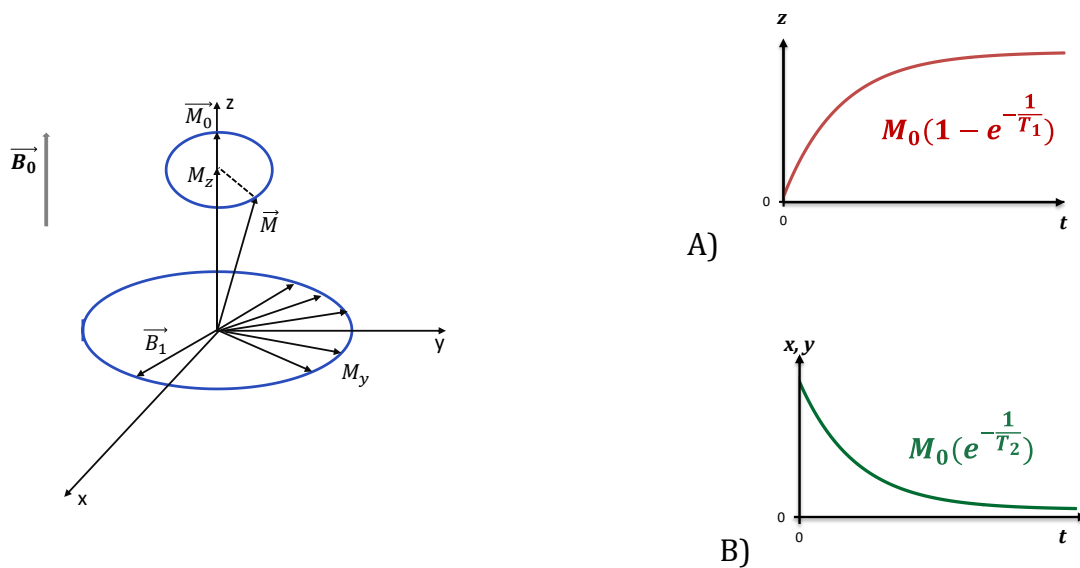


Figure I. 5 : Représentation du phénomène de résonance magnétique d'un proton soumis à un champ magnétique statique sous l'effet d'une impulsion radiofréquence B_1 , et courbe d'évolution de la relaxation longitudinale (A) et transversale (B).

Ensuite, l'aimantation nucléaire retourne spontanément et progressivement à sa position d'équilibre. Elle s'accompagne d'une émission d'énergie sous forme d'ondes radiofréquences. Une bobine servant à l'émission et réception du signal enregistre cette décroissance. Ce retour à l'équilibre appelé « relaxation » évolue d'une manière mono exponentielle et se décompose en deux phénomènes obéissant à des mécanismes très différents.

- La relaxation longitudinale qui correspond au retour à l'état d'équilibre selon l'axe z est caractérisée par le temps de relaxation longitudinal T_1 .
- La relaxation transversale qui correspond au retour à l'état d'équilibre selon les axes x et y est caractérisée par le temps de relaxation transversal T_2 .

En d'autres termes, T_1 et T_2 indiquent respectivement le temps ou bout duquel 63 % des spins sont revenus à leur état d'équilibre longitudinal (**Figure I. 5A**) et transversal (**Figure I. 5B**).

Un examen IRM peut être réalisé en se focalisant sur l'un des deux temps de relaxation. On parle alors, en fonction du mode d'acquisition, de pondération T_1 ou T_2 . Le signal d'un tissu varie alors selon ces caractéristiques ainsi que la densité en protons. En d'autres termes, les valeurs de ces variables T_1 ou T_2 sont corrélées aussi à la densité de

protons dans les tissus et/ou organes analysés et peuvent être altérés par des processus pathologiques.

L'IRM n'est malheureusement pas très sensible. Par conséquent, il est souvent nécessaire de procéder à de longues acquisitions pour augmenter le rapport signal sur bruit. Une alternative consiste à injecter un agent de contraste paramagnétique qui va améliorer le contraste des zones à analyser en modifiant les vitesses de relaxation longitudinale ou transversale des protons à proximité créant ainsi un contraste spécifique à ces zones. La capacité d'un agent de contraste à augmenter ces vitesses de relaxation de protons des molécules d'eau environnantes est appelée relaxivité.

2.1.2. Agents de contraste T_1 et T_2

Les agents de contraste peuvent être classés en deux grandes familles suivant leurs propriétés magnétiques ainsi que leurs effets sur les images (**Tableau I. 4**). On distingue alors les agents de contraste paramagnétiques et les agents de contraste superparamagnétiques. Ces deux catégories sont opposées en termes d'effets sur les images.

Dans le cas des agents de contraste superparamagnétiques ou T_2 , ces derniers sont composés de nanoparticules d'oxydes de fer de structure cristalline. Elles sont enrobées par du dextran qui est une couche protectrice organique hydrophile, ce qui va permettre la stabilisation en milieu biologique et éviter une agglomération des particules. L'épaisseur de la couche de dextran conditionne la taille globale de l'agent de contraste qui varie de 10 à 200 nm. On parle des SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxyde) lorsque la taille de particules est supérieure à 50 nm et lorsque la taille est inférieure, on parle des USPIO (Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxyde). Dans le cas de SPIO le mode d'administration peut être oral et dans le cas des USPIO par voie intraveineuse.

Aujourd'hui, les agents de contraste peuvent notamment permettre de cibler spécifiquement un organe ou une maladie donnée. La plupart des agents de contraste commerciaux sont des petites molécules extracellulaires paramagnétiques appelées agents T_1 . Elles diffusent rapidement du sang au liquide interstitiel et ont pour principal effet de diminuer le temps de relaxation longitudinal. Elles sont utilisées par exemple pour la détection des tumeurs dans le cerveau. En effet, la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) intacte empêche la diffusion de ces espèces dans le milieu

extravasculaire. La présence d'une lésion dans le cerveau rend la BHE lésée et permet alors l'accumulation des agents de contraste dans la zone malade (**Figure I. 6**).

Tableau I. 4: Classification des agents de contraste pour l'IRM en fonction de leurs propriétés magnétiques [24].

Propriétés magnétiques	Paramagnétique	Supermagnétique
Contraste	Positif (agent T_1)	Négatif (agent T_2)

La majorité des agents IRM commerciaux sont généralistes, ils ne ciblent rien particulièrement, mais on joue sur la présence de lésions engendrées par une pathologie donnée pour pouvoir identifier et distinguer des zones saines de zones malades.

2.1.2.1. Agents T_1

Les agents de contraste paramagnétiques T_1 sont des agents connus sous le nom d'agents positifs. La majorité de ces agents sont des complexes de Gd(III), même s'il existe des complexes de Mn(II) également, nous nous focaliserons par la suite sur les complexes de Gd(III).

Les agents de contraste T_1 ont fait leur apparition en 1988 sous la forme de complexe de GdDTPA (H_5DTPA = Acide DiéthylèneTriamine Pentaacétique). Aujourd'hui, plus de 40% des examens IRM sont pratiqués en injectant un agent de contraste à base de Gd(III) par voie intraveineuse. Ils se distribuent rapidement dans le milieu extracellulaire et sont éliminés par voie rénale suivant des temps de demi-vie de ~90 minutes [25]. Plusieurs agents de contraste T_1 ont été développés et sont utilisés en clinique. En voici quelques-uns sur la **figure I. 7** [26], [27].

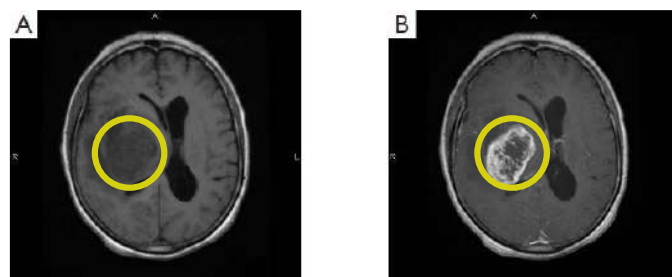


Figure I. 6 : IRM cérébrale d'un patient atteint d'une tumeur. Examen effectué sans injection d'agent de contraste (A) et avec injection d'agent de contraste (B). Il est aisé de remarquer l'apport de l'agent de contraste qui rend la tumeur beaucoup plus visible du fait de sa vascularisation et du passage plus aisé de la barrière sang/cerveau perturbée de la tumeur [28].

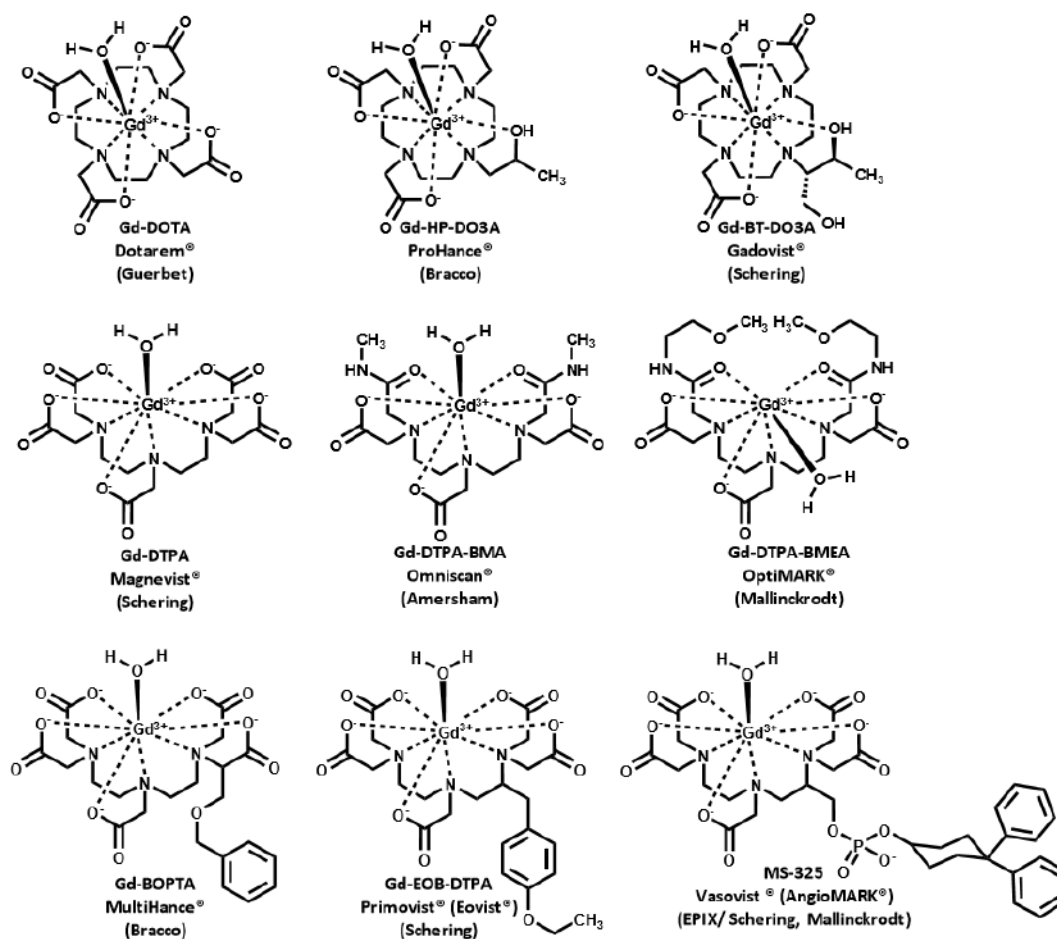


Figure I. 7 : Structures chimiques des agents de contraste commerciaux à base de Gd(III) et utilisés en clinique [26], [27].

2.2. Mécanismes de relaxivité des complexes Gd(III)

La conception d'agents de contraste toujours plus efficaces nécessite une compréhension approfondie des mécanismes contrôlant le processus de la relaxation. Ce dernier est décrit par la théorie de Solomon, Bloembergen et Morgan [29], [30], [31], [32],[33]. Cette théorie décrit la relaxation nucléaire d'un solvant protique tel que l'eau en présence d'un agent paramagnétique. Un complexe de Gd(III), par exemple, induit une augmentation des taux de relaxation longitudinaux ($1/T_1$) et transversaux ($1/T_2$) du spin des noyaux du solvant. Le taux de relaxation $1/T_{i,obs}$ est la somme de la contribution diamagnétique $1/T_{i,d}$, et de la contribution paramagnétique $1/T_{i,p}$ (**Equation I.5**). Les termes diamagnétique $1/T_{i,d}$ et paramagnétique, $1/T_{i,p}$ correspondent respectivement au taux de relaxation du proton du solvant en absence d'un agent paramagnétique et à l'augmentation de la vitesse de relaxation en présence d'agent paramagnétique.

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad \text{où } i=1, 2 \quad \text{I.5.}$$

Cette équation est valable pour une solution paramagnétique diluée et peut se réécrire sous la forme :

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i[Gd] \quad \text{où } i = 1, 2 \quad \text{I.6.}$$

L'équation (I.6) permet d'introduire une nouvelle grandeur qui est la relaxivité r_1 exprimée en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Elle est le paramètre caractéristique de l'efficacité qu'ont les agents de contraste à agir sur les protons des molécules d'eau environnantes. Il est important de noter que toute interaction chimique spécifique qui va amener les protons à proximité du centre paramagnétique va favoriser la relaxation.

Par la suite, nous nous intéresserons à la relaxation de protons des molécules d'eau en présence d'un agent de contraste à base de Gd(III). On peut alors distinguer trois contributions différentes (**Figure I. 8**) :

- **Sphère interne (inner-sphere IS en anglais)** : cette contribution résulte des molécules d'eau directement coordonnées au Gd(III). Elle fait référence à l'interaction entre le spin nucléaire, I , du proton de la molécule d'eau coordonnée et

le spin électronique S du $Gd(III)$. Cette interaction est d'origine dipolaire et diminue rapidement avec la distance r_{ie} entre I et S , en r^{-6} .

Lorsque les molécules d'eau coordonnées s'échangent avec celles de l'eau environnante, les nouvelles molécules d'eau coordonnées subissent à leur tour l'effet paramagnétique du $Gd(III)$.

- **Sphère externe ou outre-sphère (OS) :** Ce mécanisme concerne les molécules d'eau environnantes qui ressentent également les effets du paramagnétisme via des phénomènes de diffusion à proximité du centre métallique.
- **Second Sphère (2S) :** C'est un mécanisme de relaxation qui concerne les molécules d'eau qui ne sont pas directement coordonnées au $Gd(III)$ mais qui restent un certain temps à proximité, en raison d'interactions spécifiques (par exemple les liaisons hydrogène) avec le ligand ou avec les molécules de solvant en première sphère de coordination. Dans la plupart des cas ce mécanisme n'est pas séparé du mécanisme IS.

L'augmentation paramagnétique du taux de relaxation est alors la somme des deux contributions IS et OS (**Equation I.7**), il en est de même pour la relaxivité (**Equation I.8**).

$$\left(\frac{1}{T_{i,p}}\right) = \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_{i,p}}\right)^{OS} \quad \text{I.7.}$$

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} \quad \text{I.8.}$$

La contribution de la sphère externe est pratiquement impossible à moduler, contrairement à celle de la sphère interne que le chimiste peut considérablement augmenter par un design moléculaire approprié.

2.3. Paramètres influençant le mécanisme de sphère interne

Pour la description et la compréhension de la relaxivité, nous nous limiterons aux équations de relaxivité longitudinale ainsi qu'au mécanisme de la sphère interne quand il y a des molécules d'eau coordonnées au Gd(III).

Les paramètres modulant la relaxivité via le mécanisme de la sphère interne sont illustrés dans la **figure I. 8** et donnés par l'équation **I.9**.

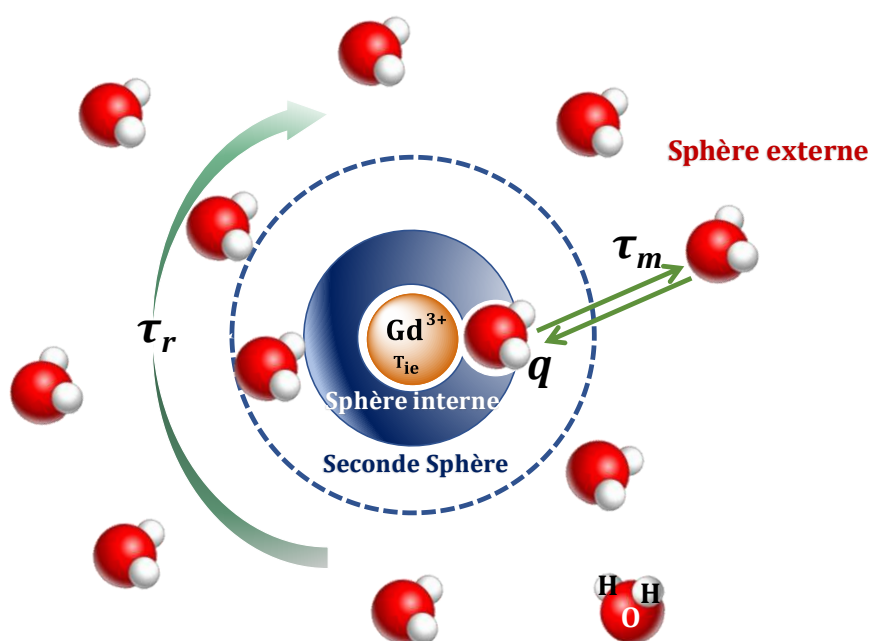


Figure I. 8 : Représentation schématique d'un complexe de Gd(III) avec une molécule d'eau dans la première sphère de coordination. τ_R est le temps de corrélation rotationnelle du système, τ_m est le temps de vie de la molécule d'eau coordonnée en première sphère et T_{ie} est le temps de relaxation électronique du Gd(III).

$$r_1^{IS} = \frac{cq}{55.5} \left(\frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \right) \quad \text{I.9.}$$

où c est la concentration molaire de l'agent, q est le nombre de molécule d'eau dans la première sphère de coordination de Gd(III), τ_m est la durée de vie de la molécule d'eau dans la sphère interne du complexe (égale à l'inverse de la vitesse d'échange d'eau,

$1/k_{ex}$) et T_{1m} est le temps de relaxation longitudinal des protons d'une molécule d'eau qui serait liée de façon permanente au Gd(III). T_{1m} dépend du temps de corrélation rotationnel (τ_r), des temps de relaxation électroniques (T_{1e} et T_{2e}), ainsi que du champ (Equation I.10 et I.11).

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{(r_{GdH})^6} \left[\frac{3\tau_{c1}}{(1+\omega_I^2 \tau_{c2}^2)} + \frac{7\tau_{c2}}{(1+\omega_S^2 \tau_{c2}^2)} \right] \quad \text{I.10.}$$

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{ie}} \quad i = 1, 2 \quad \text{I.11.}$$

Avec

- S le nombre quantique de spin électronique
- γ_I le rapport gyromagnétique nucléaire du proton
- μ_B le magnéton de Bohr
- g le facteur de Landé pour l'électron libre
- r_{GdH} la distance entre le spin nucléaire I (du proton) et le spin électronique S
- ω_I et ω_S les fréquences de Larmor pour le proton et l'électron ($\omega_S = 658 \omega_I$)
- τ_{ci} ($i=1,2$) le temps de corrélation relatif à la dynamique du couple $S-I$

De ces équations, il ressort quelques paramètres qui peuvent être modifiés afin d'améliorer la relaxivité :

- q : la relaxivité de la sphère interne est directement proportionnelle au nombre de molécules d'eau directement liée au centre métallique. Cependant, il est important de trouver un équilibre entre l'efficacité et l'utilisation sûre (en termes de toxicité), car l'augmentation de q entraîne généralement une diminution de la stabilité du complexe métallique. Le complexe doit être suffisamment stable et ne pas se dissocier avant son excrétion complète du corps.
- $k_{ex} = 1/\tau_m$: est la constante de vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées au centre métallique avec les molécules d'eau du solvant. La vitesse d'échange doit être à une valeur optimale. Si l'échange d'eau est trop lent, l'effet paramagnétique ne sera pas correctement transmis à la solution; si elle est trop

rapide, la molécule d'eau liée n'aura pas assez de temps pour ressentir l'effet paramagnétique de l'ion métallique.

- T_{1e} et T_{2e} : il est clair que les temps de relaxation électroniques longitudinaux et transversaux influencent la relaxivité, mais jusqu'à présent, très peu de succès ont été obtenus pour relier cet effet aux caractéristiques structurales des ligands. La théorie de la description de ces paramètres électroniques est en soi complexe [34].
- τ_R : est le temps de corrélation rotationnelle. C'est le paramètre le plus important qui limite la relaxivité des petites molécules utilisées actuellement comme agents de contraste commerciaux [35].

On peut donc voir l'influence du champ magnétique (ω_I , ω_S) sur la relaxation électronique et de manière plus générale, sur la relaxivité de la sphère interne (**Equation I.10**). L'étude de la relaxivité en fonction du champ est donc primordiale pour la caractérisation d'un agent de contraste. La mesure de temps de relaxation en fonction du champ magnétique est appelée relaxométrie. Un profil relaxométrique ou NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) correspond au tracé de la relaxivité en fonction du champ. L'allure du profil permet d'accéder à une interprétation qualitative des mécanismes de relaxation. Ainsi, une apparition d'une bosse aux champs intermédiaires (entre 20 et 80 MHz) mais aussi la dépendance en température permettent de conclure quant à la limitation de la valeur de la relaxivité par l'échange des molécules d'eau ou la rotation du système.

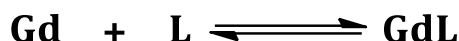
Ces paramètres doivent être pris en compte pour la conception d'agents de contraste hautement efficaces. Le défi du chimiste est donc d'optimiser simultanément l'ensemble de ces paramètres. C'est ainsi que diverses approches ont été exploitées pour τ_R . Cela a consisté principalement à développer des ligands de poids moléculaire important par la fixation du chélate de type poly(aminocarboxylate) aux macromolécules, telles que les protéines [36], [37], les micelles [38] et les dendrimères [39].

2.4. Stabilité des agents de contraste à base de Gd(III)

Les agents de contraste à base de Gd(III) sont principalement constitués de ligands polyamino polycarboxylates soit macrocycliques, soit linéaires. Ces types des ligands sont parfaitement adaptés à la complexation du Gd(III) car ils offrent plusieurs sites de complexation et peuvent ainsi conduire à la formation de complexes de Gd(III) stables. En général, les complexes de Gd(III) macrocycliques possèdent une stabilité thermodynamique similaire aux complexes de Gd(III) linéaires. Cependant, leurs inerties cinétiques sont différentes.

2.4.1. Stabilité thermodynamiques des complexes de Gd(III)

La formation d'un complexe GdL est caractérisée par sa constante de stabilité thermodynamique qui est exprimée par l'équilibre ainsi que l'équation suivante (**Equation I.12**).



$$K_{GdL} = \frac{[\text{GdL}]}{[\text{Gd}][\text{L}]} \quad \text{I.12.}$$

où [Gd], [L] et [GdL] sont respectivement les concentrations de l'ion Gd(III) libre, du ligand déprotoné et du complexe à l'équilibre.

Puisque la formation du complexe est une réaction compétitive entre les ions métalliques et l'hydrogène pour le ligand libre, les constantes de protonation K_i du ligand sont également nécessaires pour le calcul de la constante de stabilité du complexe (**Equation I.13**).

$$K_i^H = \frac{[\text{H}_i\text{L}]}{[\text{H}_{i-1}\text{L}][\text{H}^+]} \quad \text{I.13.}$$

où $i=1, 2, \dots, n$ et $[\text{H}^+]$, $[\text{H}_i\text{L}]$ et $[\text{H}_{i-1}\text{L}]$ représentent respectivement les concentrations de H^+ , H_iL et H_{i-1}L à l'équilibre.

D'autre part, les complexes formés peuvent également posséder des sites de protonation qui sont définis par l'équation **I.14**.

$$K_{MH_iL} = \frac{[M(H_iL)]}{[M(H_{i-1}L)][H^+]} \quad \text{I.14.}$$

où $i=1, 2, \dots, n$ et $[H^+]$, $[M(H_iL)]$ et $[M(H_{i-1}L)]$ sont respectivement les concentrations de H^+ , $M(H_iL)$ et $M(H_{i-1}L)$ à l'équilibre.

On notera que plus la constante de stabilité est élevée, moins il y a de Gd(III) libre présent dans le milieu. Néanmoins cette valeur de Gd(III) dépend également des constantes de protonation. Afin de pouvoir comparer les complexes entre eux, la notion de pGd a été introduit (**Equation I.15**).

$$p[Gd] = -\log[Gd] \quad \text{I.15.}$$

Cette constante est calculée dans des conditions standards décrites par Paul-Roth et Raymond ($pH=7,4$; $[Gd(III)]=1\mu M$; $[ligand]=10\mu M$) [40]. D'autre part, *in vivo* le ligand peut être protoné ou peut former un complexe avec des cations endogènes tels que le Ca(II), Cu(II) et Zn(II). Cacheris *et al.* ont défini la constante conditionnelle K^*_{GdL} qui évalue la sélectivité du ligand pour Gd(III) par rapport à d'autres cations endogènes selon l'équation **I.16** [41].

$$K^*_{GdL} = \frac{K_{GdL}}{\alpha_H^{-1}} \quad \text{I.16.}$$

avec $\alpha_H^{-1} = (1 + K_1[H^+] + K_1K_2[H^+][H^+]^2 + \dots + K_1K_2K_n[H^+][H^+]^2[H^+]^n)$ et $K_1, K_2, \dots, K_n$ sont les différentes constantes de protonation du ligand.

2.4.2. Cinétique de dissociation des complexes de Gd(III)

L'inertie cinétique du complexe de Gd(III) dépend de la vitesse des réactions d'échange qui peuvent avoir lieu dans un milieu donné (le corps humain par exemple). Le plus important est probablement le déplacement de Gd(III) par les autres métaux endogènes,

comme Cu(II) et Zn(II)[42]. Cela peut se produire par l'attaque directe du métal endogène sur **GdL**, ou par la dissociation assistée par le proton du complexe, suivi de la rapide réaction de complexation entre le ligand et les métaux endogènes. Les réactions d'échange de ligands entre **GdL** et les ligands présents dans le plasma sanguin sont habituellement considérées comme faiblement probables. Au cours des dernières décennies, Brücher *et al.* ont publié un certain nombre de travaux relatifs à la compréhension de la dissociation des agents de contraste IRM à base Gd(III) [42]. De nos jours, il est clair que la cinétique de dissociation des complexes de Ln(III) avec des ligands macrocycliques et linéaires diffère considérablement, car la rigidité des complexes macrocycliques entraîne une dissociation lente par rapport aux complexes linéaires [43]. Dans le cas de **GdDTPA**, qui est probablement l'agent de contraste IRM le plus utilisé aujourd'hui, un modèle cinétique complet a été établi afin de décrire la dissociation du complexe dans le corps [43].

3. Imagerie moléculaire : développement d'agents de contraste IRM responsifs

L'Imagerie Moléculaire (IM) est une nouvelle technique de la médecine personnalisée. Elle cherche à détecter *in vivo* les événements moléculaires se produisant au niveau cellulaire. Il devient alors possible de détecter des paramètres physico-chimiques des tissus tels que le pH, la température, la concentration des ions, les processus enzymatiques etc... Contrairement à l'imagerie anatomique, l'imagerie moléculaire nécessite toujours une sonde d'imagerie moléculaire spécifique pour l'évènement que l'on cherche à détecter. L'IRM est particulièrement bien adaptée à la détection de ces paramètres puisque la conception de sondes dites « intelligentes » ou activables est possible. Ces complexes sont conçus pour être conditionnellement activés par un processus biochimique ou physiologique [44]. De telles sondes sont d'une grande utilité pour les applications d'imagerie moléculaire, permettant aux chercheurs de comprendre et surveiller les processus physiologiques *in vivo* en utilisant l'imagerie non invasive. Depuis l'introduction du premier agent de contraste responsif par Meade *et al.* activé

par une enzyme, la β -galactosidase, [44], [45], [46], [47], plusieurs autres agents de contraste responsifs ont été développés [48], [49], [50].

Dans ce manuscrit, nous allons nous concentrer sur les agents de contraste intelligents à base de Gd(III).

3.1. Mécanisme de la bioactivation

3.1.1. Principe et paramètres à détecter

La détection des paramètres physiologiques par IRM est basée sur la modification de paramètres microscopiques influençant l'efficacité d'un agent de contraste. Puisque le chimiste est capable de modifier τ_R et q , la détection est alors basée sur ces deux paramètres.

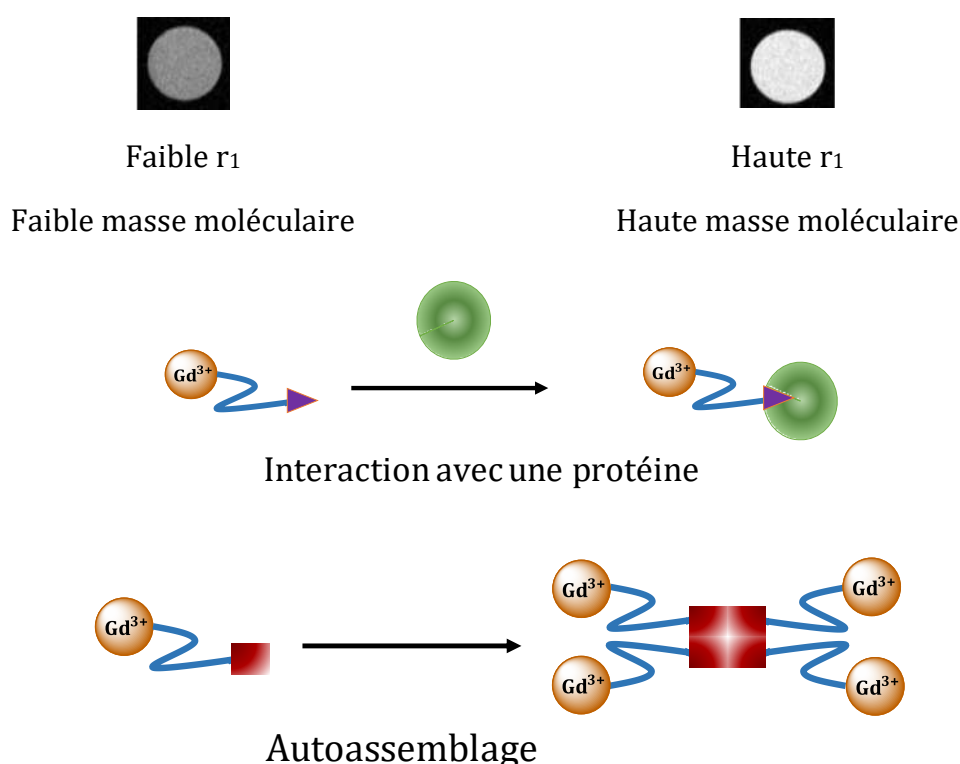


Figure I. 9 : Les agents de contraste responsifs par modulation de τ_R . Ils subissent une augmentation de la masse molaire lors de l'activation par un éventuel intérêt provoquant une augmentation de τ_R et par conséquent de la relaxivité. Cela se fait soit par liaison avec les protéines ou autoassemblage.

Dans le cas de la détection par modulation de τ_R , les sondes subissent une augmentation du poids moléculaire en réponse à l'événement d'intérêt, par conséquent la rigidité du système augmente, ce qui se traduit par une augmentation de τ_R et donc une augmentation de la relaxivité r_1 . De telles augmentations de la masse moléculaire se produisent généralement en raison de la liaison à des protéines (interaction) ou de l'auto-assemblage induit par le processus d'intérêt (**Figure I. 9**). Par exemple, un complexe de Gd(III) de faible masse moléculaire peut être marqué avec une fonction sélective pour interagir avec une grosse molécule ou une protéine. Lors de l'interaction, la masse moléculaire de l'agent est considérablement augmentée avec une augmentation de τ_R . Ainsi, une augmentation du contraste au niveau de l'image IRM est observée. L'effet du τ_R est plus important aux champs intermédiaires (20-60 MHz).

La conception des sondes par modulation de q est axée sur l'arrangement de l'environnement de coordination du Gd(III) (**Figure I. 10**). De telles sondes se composent de trois parties principales : une partie complexante de Gd(III), et une partie spécifique pour l'évènement que l'on cherche à détecter, ainsi qu'un linker moléculaire. Avant la détection, le domaine bioresponsif est associé au Gd(III) par interaction faible, mais limitant l'accès de l'eau au centre métallique, créant un état de relaxation faible avec q faible. En présence du processus que l'on cherche à détecter, le complexe subit un changement structural qui entraîne la dissociation du domaine bioresponsif du centre de Gd(III). Cela conduit à l'ouverture d'un site de coordination permettant donc l'entrée d'une ou plusieurs molécules d'eau dans la première sphère de coordination de Gd(III) et créant un état de forte relaxivité avec un q plus important (**Figure I. 10**).

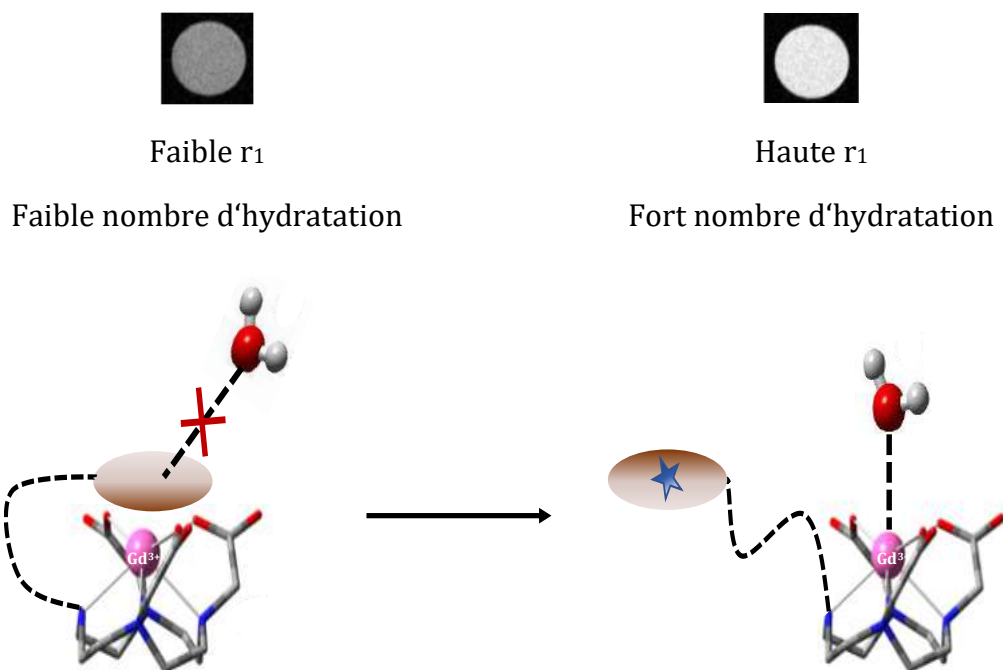


Figure I. 10 : En réponse à l'événement biologique d'intérêt, les agents de contraste par modulation de q passent d'une faible relaxivité (état $q = 0$) à une forte relaxivité (état $q = 1$).

Cette dissociation peut se produire de deux manières différentes. Le groupe fonctionnel de reconnaissance peut se lier sélectivement au substrat détecté (comme c'est le cas pour les agents sensibles aux ions) ou la partie responsive est clivée entièrement (exemple des sondes activées par des enzymes).

3.1.2. Quelques exemples

3.1.2.1. Agents responsifs pour la détection de l'activité enzymatique

La détection *in vivo* en temps réel et de façon non invasive de processus enzymatiques présente un enjeu majeur puisque leur présence, ou leur absence ainsi que la modification de leur concentration et/ou activité peut être responsable d'un état pathologique. La détection d'un dysfonctionnement permettrait de faire un diagnostic beaucoup plus précoce de diverses maladies dans lesquelles les enzymes sont impliquées, et par conséquent d'élaborer un traitement beaucoup plus efficace.

L'IRM est bien adaptée pour la détection *in vivo* de l'activité enzymatique étant donné que le caractère catalytique de la réaction enzymatique va permettre une activation de l'agent de contraste même à de faible concentration en enzyme et permettre de s'affranchir de la faible sensibilité de la technique. Dans ce cadre, un grand nombre d'agents de contraste pour la détection enzymatique par variation de q et de τ_r ont été développés au cours de ces deux dernières décennies. Le premier agent de contraste pour la détection enzymatique a été conçu par Meade et ses collaborateurs [44], [46], [45]. Basé sur une variation de q , cet agent de contraste constitué d'un chélate de Gd(III) de type DO3A porte un résidu du galactopyranose qui inhibe l'accès à une molécule d'eau au centre Gd(III). En présence de la β -galactosidase, le fragment de sucre est clivé du complexe, ouvrant l'accès à une molécule d'eau au centre Gd(III) entraînant ainsi une augmentation de la relaxivité de 20 % après clivage enzymatique (**Figure I. 11A : Gd1**). Cet agent a été utilisé avec succès *in vivo* pour la détection de l'expression de l'acide ribonucléique messager β -galactosidase dans des embryons *Xenopus laevis* [45].

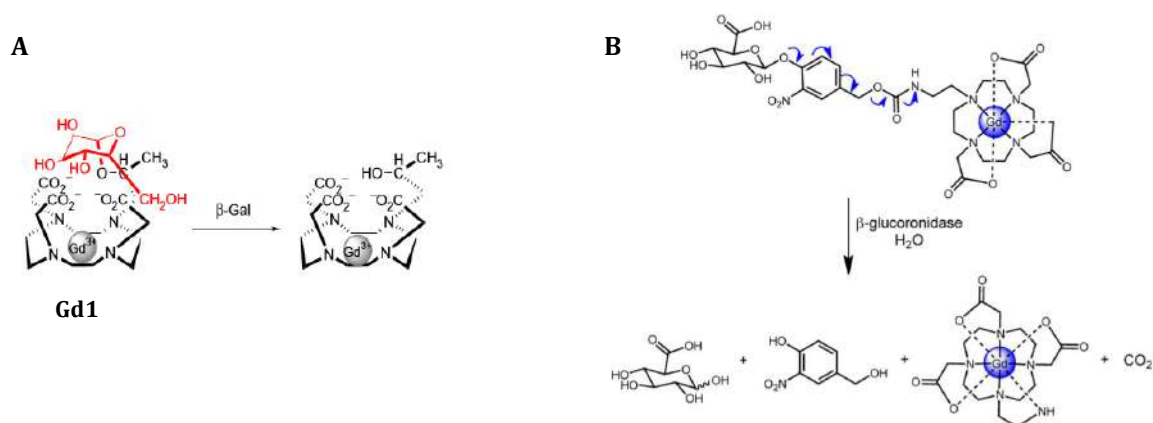


Figure I. 11 : Agents de contraste pour la détection enzymatique par variation de q : A) avec une coupure simple de la galactopyranose qui inhibe l'accès à une molécule d'eau au centre Gd(III) [44], [45], [46]. B) En présence de la β -glucuronidase, le sucre se trouvant sur l'agent de contraste est coupé en provoquant une cascade électronique qui induit l'autodestruction de l'espaceur auto-immolable [51].

Toujours par variation de q , dans un autre exemple, le chélate de Gd(III) de type DO3A est relié au substrat de la β -glucosidase par le biais d'un espaceur auto-immolable. La coupe du substrat par l'enzyme provoque une cascade électronique induisant l'autodestruction de l'espaceur auto-immolable. La structure moléculaire de l'agent de

contraste ainsi modifiée donne place à un nouveau groupement de coordination sur le centre métallique. Il y a alors une diminution du nombre de molécules d'eau entraînant une baisse de la relaxivité (**Figure I. 11B**) [51].

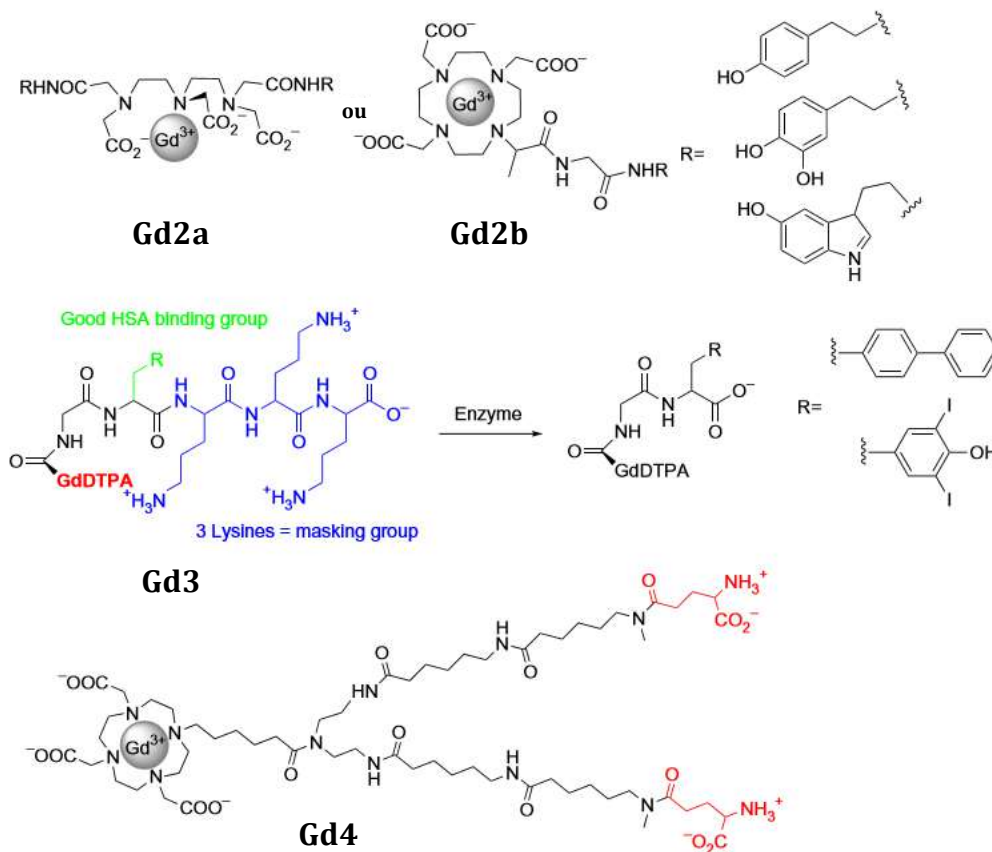


Figure I. 12 : Agents de contraste T_1 pour la détection des activités enzymatiques par variation de τ_r

La modulation de la relaxivité par un changement de temps de corrélation rotationnel a également été exploitée, surtout dans le cadre de la détection d'oxydoréductases et de transférases. Les enzymes impliquées dans ces processus sont capables de catalyser la formation de liaisons chimiques intermoléculaires, induisant la formation d'agrégats ou des phénomènes d'oligomérisation. Dans les deux cas, il en résulte une augmentation de la taille de l'agent de contraste provoquant une augmentation de τ_r et donc de la relaxivité.

Dans ce cadre, des équipes ont développées des agents dérivés du GdDTPA et du GdDOTA (**Figure I. 12, Gd2a et Gd2b**) pour imager les processus enzymatiques [52],

[53], [54], [55]. Notamment, la peroxydase de raifort (HRP), la myeloperoxydase ainsi que la tyrosinase ont été détectées en utilisant ces complexes.

Dans le cas du complexe GdDOTA-hydroxytyramide (**Figure I. 12**), la polymérisation de l'agent de contraste par l'action de peroxydases va augmenter le temps de corrélation rotationnelle et causer la diminution du temps de relaxation T_1 de l'agent de contraste [52]. Une polymérisation spontanée de l'agent de contraste est observée lors d'un clivage par des acides stéariques présents sur la structure chimique d'un complexe de Gd(III) par l'activité des estérases. Ainsi une diminution du temps de relaxation T_1 est observée [56].

Toujours dans l'objectif d'augmenter la relaxivité lors de la détection enzymatique par IRM, Caravan *et al.* ont exploité la différence d'affinité de liaison entre l'agent de contraste et l'HSA (Albumine de Sérum Humain) avant, et après réaction enzymatique [57]. Dans cet exemple (**Figure I. 12, Gd3**), l'agent de contraste est composé d'un chélate de Gd(III) de type DTPA, comportant un groupement diphénylalanine (ou 3,5-diiodotyrosine) possédant une bonne affinité de liaison avec la HSA cependant masqué par trois résidus lysine. Avant la réaction enzymatique, le complexe a une affinité très faible pour l'HSA, et après réaction enzymatique, l'affinité pour la HSA, et par conséquent la relaxivité, sont améliorées.

Dans un but d'augmenter l'efficacité de l'agent de contraste pour la détection du processus enzymatique, un autre complexe de Gd(III) (**Figure I. 12, Gd4**) a été développé par Aime et ses collaborateurs [58]. La particularité de cet agent intelligent est qu'il permet simultanément de varier le temps de corrélation rotationnel et le nombre d'hydratation du système avant et après la réaction enzymatique. Dans cet exemple, l'agent responsive à l'acide glutamique décarboxylase qui est présent dans les neurones comporte une entité complexante de Gd(III) ainsi que deux motifs glutamates. Sous l'action de l'enzyme, il y a coupure des fonctions glutamate et donc augmentation de q et formation des charges positives sur les résidus de la molécule, favorisant les liaisons entre l'agent de contraste et certaines macromolécules endogènes comportant des charges négatives.

3.1.2.2. Agents de contraste sensibles au pH

La détermination du pH *in vivo* est un objectif important pour l'imagerie médicale, puisque certaines pathologies sont associées à la perturbation dans l'homéostasie du pH. Notamment, un tissu tumoral aura un pH acide comparé aux tissus sains [59], [60]. Ce pH acide des tumeurs a de nombreuses conséquences, y compris la résistance aux radiothérapies et aux chimiothérapies [61].

La diminution du pH extracellulaire a été observée dans de nombreux cancers et diverses maladies ischémiques [62]. Il pourrait être un biomarqueur pour non seulement des fins de diagnostic, mais aussi pour les applications cliniques liées à la surveillance de la progression de la maladie, et/ou à la réponse à la thérapie [63], [64].

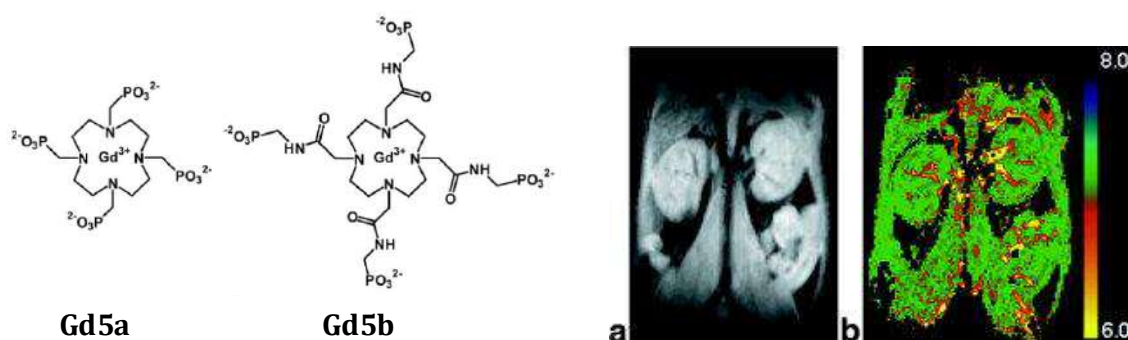


Figure I. 13 : Structures des agents de contraste sensibles au pH. a) image anatomique des reins d'une souris et b) cartographie de pH des reins de la même souris obtenue après injection de l'agent de contraste sensible au pH [65].

Parmi les nombreux exemples de sondes IRM sensibles au pH, certaines ont démontré leur utilité pour des applications *in vivo*. L'un des premiers et les plus largement caractérisés a été développé par Sherry et ses collaborateurs [66]. En effet, l'injection successive d'un composé de type dérivé amido-phosphonate de GdDOTA (**Figure I. 13 Gd5a**), sensible au pH, puis d'un analogue (GdDOTP) (**Figure I. 13 Gd5b**) non sensible au pH, a été employée dans le but de réaliser une image des reins d'une souris (**Images a et b de la figure I. 13**). En effet, la concentration inconnue de l'agent intelligent dans le tissu est un problème majeur pour déterminer le pH. L'hypothèse faite est que les deux

composés ayant la même biodistribution, la concentration du premier peut être déduite du second [65].

Ce mélange a également été utilisé afin d'obtenir une carte du pH du milieu extracellulaire dans un modèle de gliome de rat [67]. Les valeurs de pH ont été calculées grâce à une méthode par calibration, et des différences d'environ une unité de pH ont pu être détectées.

3.2. Détection des cations métalliques

Les cations métalliques sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux. Leur concentration est hautement régulée dans les systèmes vivants. Toute perturbation dans leur homéostasie est impliquée dans des pathologies tels que les maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson), le diabète ou le cancer. Par conséquent, la compréhension de la biodistribution des métaux ainsi que leur quantification dans les systèmes vivants par des techniques d'imagerie non-invasive est primordiale dans la recherche biomédicale. Cela permettrait de mieux comprendre leur homéostasie et les maladies qui y sont liées et conduirait à un diagnostic plus précoce et des traitements plus efficaces de ces maladies. La chimie se trouve au centre de ces développements et la conception de sondes IRM dites « intelligentes » à base de Gd(III) pour la détection des cations métalliques est fondamentale. Au cours de ces dernières années, de nombreux exemples de sondes sensibles aux cations métalliques sont apparus dans la littérature. Pourtant, malgré les progrès récents, très peu de sondes ont été utilisées jusqu'à des applications *in vivo*. Plusieurs contraintes sont à l'origine de ce frein. Tout d'abord, il est important de concevoir des sondes spécifiques à chaque cation métallique, voire même à un état d'oxydation donné, par exemple dans le cas du cuivre. Ensuite, afin de ne pas perturber l'homéostasie des cations *in vivo*, il faut concevoir des sondes avec des affinités adaptées aux concentrations physiologiques. Ceci peut être délicat car le cation est constamment en équilibre entre sa forme libre et complexée aux protéines. L'affinité à viser sera également fonction de l'affinité du cation pour les différentes protéines. Enfin, le flux des ions que l'on souhaite détecter peut être très rapide, se produisant sur une échelle de temps pouvant descendre à la microseconde.

C'est le cas pour la détection du changement de la concentration de Ca(II) pour les applications en neuroimagerie. Cela nécessite donc des acquisitions très rapides.

3.2.1. Sondes responsives aux cations Ca(II) et Cu(II)

3.2.1.1. Détection du Ca(II)

Le calcium est un nutriment nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme. Il joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques tels que la formation des os, la transduction, la contraction musculaire ou encore au niveau neuronal. Dans le sang, le calcium est important pour un certain nombre de fonctions, y compris la coagulation du sang, la stabilité des membranes cellulaires et le métabolisme cellulaire [68].

Le calcium est l'élément minéral le plus abondant dans le corps (1200-1400g). Environ 99% du contenu total en calcium se trouve dans les cartilages osseux et calcifié sous forme de phosphate de calcium et de sulfate de calcium. Seulement environ 1% de ce cation se trouve dans les liquides extracellulaires et intracellulaires [68].

Vu son rôle dans plusieurs processus biologiques, sa concentration doit être soigneusement contrôlée. Sa détection et sa quantification en temps réel pourrait entre autre permettre de mettre en évidence, voire de mesurer directement, l'activité neuronale du cerveau car celle-ci est caractérisée par une variation significative de la concentration en calcium.

Dans le domaine de la conception des agents responsif au calcium, Li *et al* sont les pionniers. Lors des études de la détection de Ca(II) avec une sonde comportant deux entités dérivées du D03A et actifs en IRM (**Figure I. 14 Gd6**), une réponse au calcium a été observée. Ces travaux ont montré le rôle important que joue le calcium intracellulaire dans la transduction du signal [69], [70].

Dans ce système, l'unité centrale qui relie les deux macrocycles est composée d'un groupe BAPTA (acide 1,2-O-amoniphenoxy-N,N,N',N'-tetraacétique) qui est un chélatant fluorescent sélectif au Ca(II) [71]. Une augmentation de la relaxivité de 77 % a été obtenue en présence de Ca(II) . Une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire

a été obtenue avec ce système. Cela correspond bien à la gamme de concentration intracellulaire. Ici, l'augmentation de la relaxivité est due à la variation du nombre de molécule d'eau comme on peut le voir sur la **figure I. 14**. En présence de Ca(II) , la sonde subit une légère modification conformationnelle, ce qui rend le Gd(III) plus accessible aux molécules d'eau.

En ce qui concerne la détection par IRM, il semble plus raisonnable de cibler la gamme de concentration extracellulaire de Ca(II) (millimolaire) car ces concentrations plus élevées sont plus en adéquations avec les concentrations d'agents de contraste utilisées lors des examens IRM.

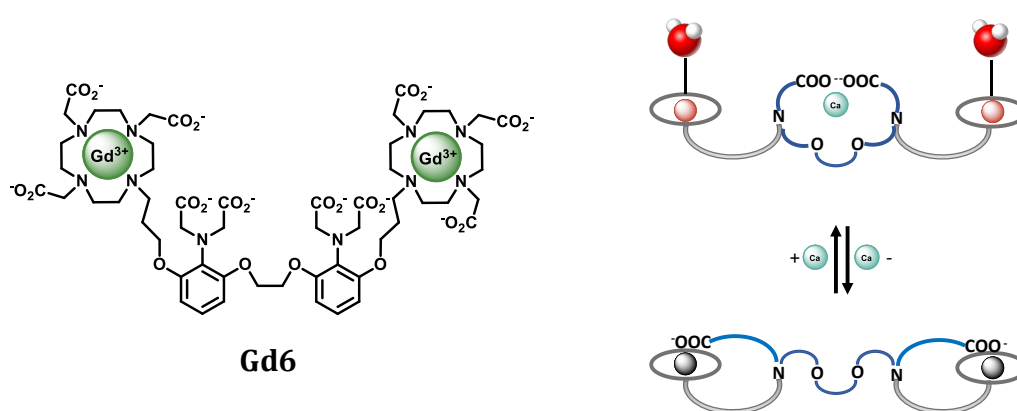


Figure I. 14 : A gauche : complexe GdDOPTA (**Gd6**) responsif au Ca(II) . À droite (une représentation schématique) : lors de la détection avec Ca(II) , une décoordination de la partie sensible au Ca(II) entraîne une ouverture au niveau des chélates de Gd(III) , conduisant donc à l'entrée des molécules d'eau dans la sphère de coordination du Gd(III) . Cela présente un changement de relaxivité élevé et le mécanisme est réversible [72].

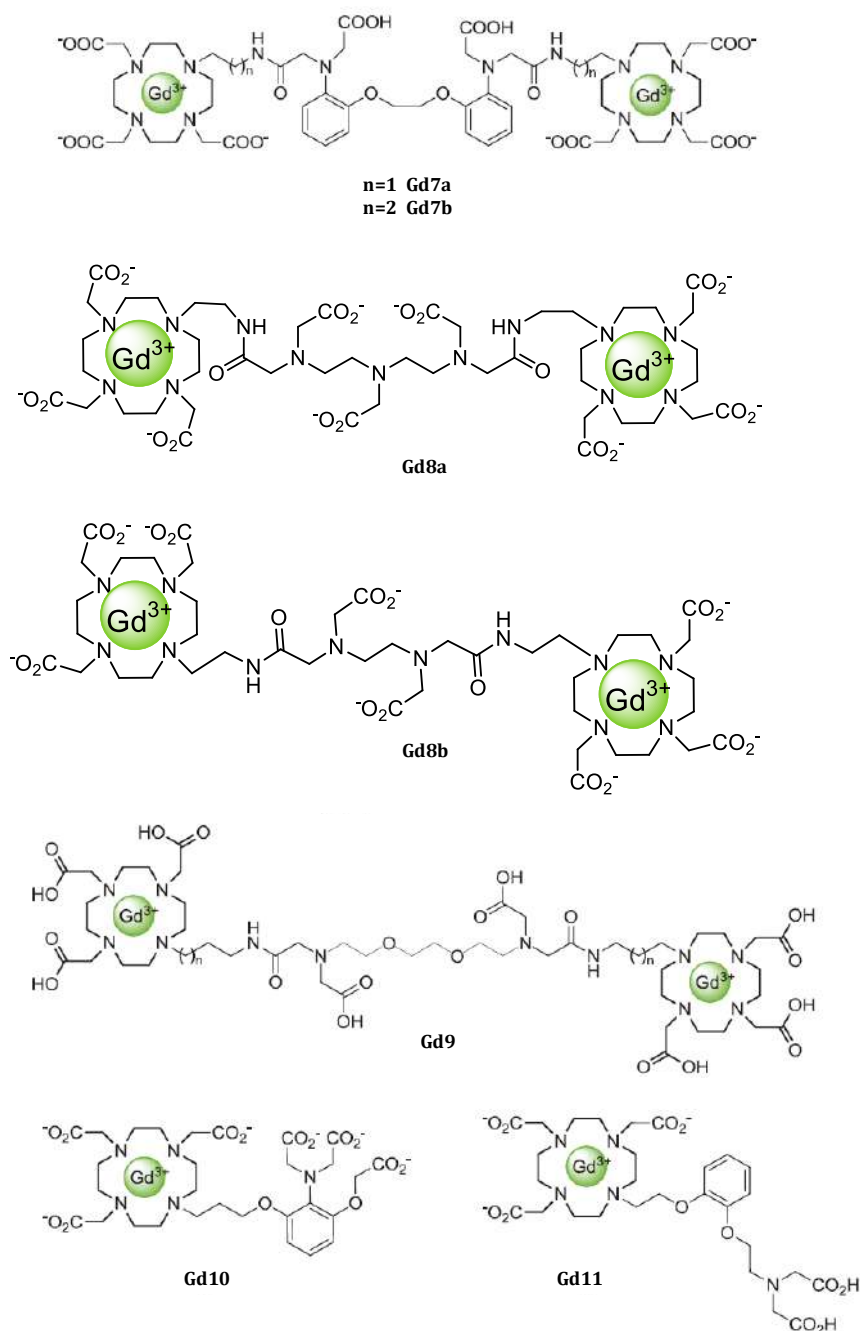


Figure I. 15 : Autres sondes pour la détection de Ca(II).

Dans l'objectif d'optimiser la réponse au Ca(II), d'autres agents de contraste ont été développés. Notamment, Jakab-Toth *et al.* ont conçu les complexes **Gd7a** et **Gd7b** en remplaçant deux fonctions carboxylate du BAPTA par des fonctions amides moins coordinantes, afin de diminuer l'affinité pour le Ca(II) (**Figure I. 15**) [73]. Une

augmentation de la relaxivité de 15 et 10 % respectivement a été obtenue avec une sélectivité satisfaisante pour le Ca(II) par rapport au Mg(II).

Le BAPTA a également été remplacé par des dérivés bisamide de EDTA (**Gd8a**), DTPA (**Gd8b**) [74] ou EGTA (Acide éthylène glycol tetraacétique) (**Figure I. 15 Gd9**) [75]. Ce dernier complexe a montré une augmentation de la relaxivité de 70-80 % lorsque le calcium est complexé. Cette augmentation est en majeure partie due à l'augmentation du nombre d'hydratation q mais aussi à la rigidification du complexe lorsque le calcium est présent. Ces différents systèmes ont été testés *in vitro* dans des conditions chargées de mimer le milieu extracellulaire du cerveau, et ils ont montré une variation d'environ 10 % de la relaxivité, ce qui est détectable en IRM.

Un autre exemple d'agent responsif au Ca(II) est le complexe **Gd11** comportant des fonctions catéchols et qui a montré une bonne sélectivité pour le Ca(II) par rapport aux ions Na(I), K(I), Mg(II), Zn(II) et Cu(II) ainsi qu'une variation de 63 % de la relaxivité en présence du Ca(II) [76]. Quant au complexe **Gd10**, Dhingra *et al.* ont observé une variation de relaxivité d'environ 100 % en présence de Ca(II) et avec une bonne sélectivité par rapport au Mg(II) et au Zn(II) [77].

3.2.1.2. Détection du cuivre

Le cuivre est un oligoélément requis pour tous les organes vivants. Il sert de cofacteur redox-actif dans de nombreux processus enzymatiques des cellules eucaryotes, y compris la cytochrome c oxydase, la superoxyde dismutase et la tyrosinase. Dans le système biologique, on le trouve sous deux états d'oxydation différents : Cu(II) qui est majoritairement extracellulaire et Cu(I) qui est majoritairement intracellulaire.

Il est le troisième métal de transition le plus abondant dans l'organisme, après le zinc et le fer. Ces concentrations extracellulaires sont de 10 à 25 μM dans le sérum, de 0,5-2,5 μM dans le liquide céphalo-rachidien, de 30 μM dans la fente synaptique [78]. En ce qui concerne le cuivre intracellulaire, dans le neurone par exemple il peut atteindre 2 à 3 ordres de grandeur de concentrations plus élevés.

Le cuivre participe à des réactions d'oxydo-réduction qui génèrent le radical hydroxyle, ce qui provoque des dommages catastrophiques aux lipides, aux protéines et à l'ADN [79]. Comme pour le calcium, une mauvaise régulation de son homéostasie et/ou l'incapacité de le distribuer de manière appropriée aux cellules et aux tissus [80] peut entraîner un certain nombre de maladies graves [81] telles que les maladies de Wilson et Menkes, ou des maladies neurodégénératives (Alzheimer).

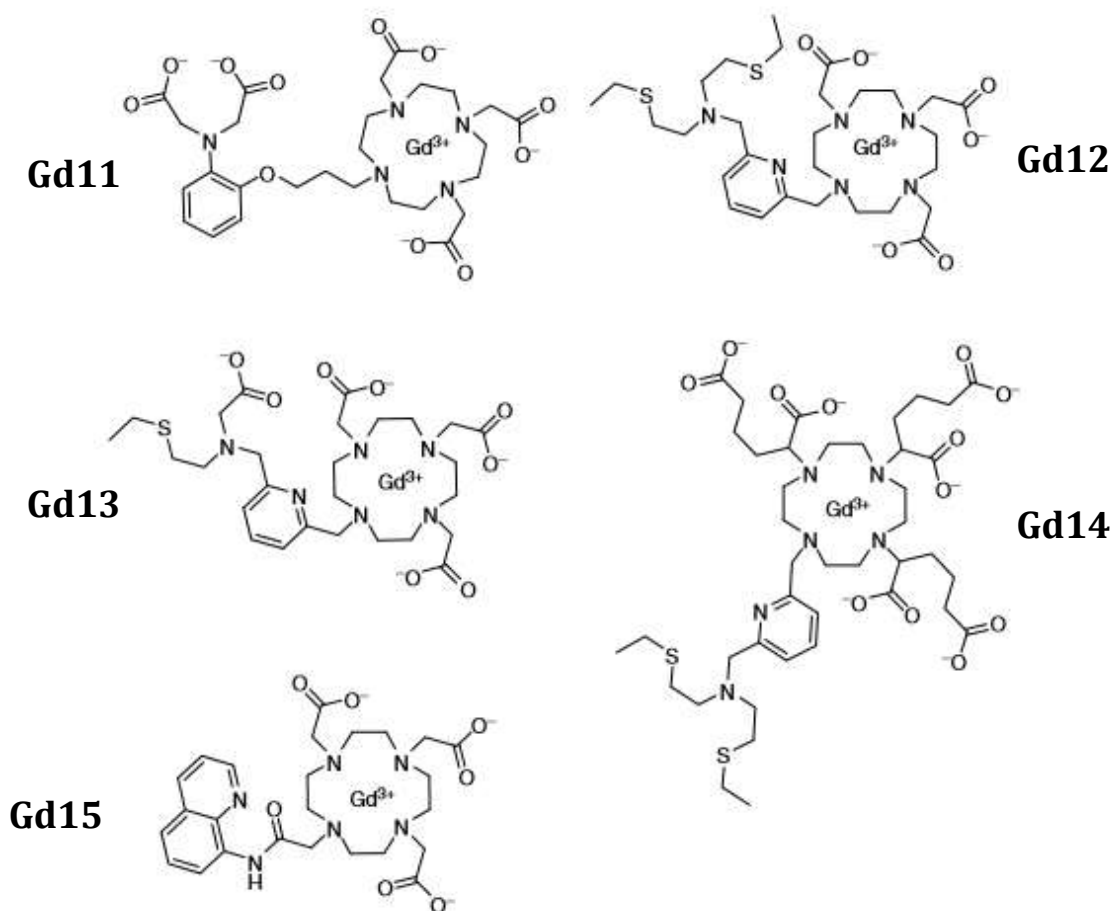


Figure I. 16 : Sondes responsives au cuivre

L'intérêt de sa détection par des techniques non invasives telles que l'IRM n'est donc plus à démontrer et plusieurs sondes IRM responsives au cuivre ont été conçues ces dernières années. La plupart de ces composés sont dérivé du DOTA pour la partie complexante de Gd(III). Quelques sondes dérivées du DTPA existent également. Pour la partie complexante et sélective au cuivre, une contrainte supplémentaire se pose

puisque cette unité devrait idéalement être sélective pour un seul état d'oxydation. Comme le montre la **figure I. 16**, l'utilisation d'un bras iminodiacétate dans un complexe basé sur GdDO3A (**Gd11**) conduit à un agent responsif au Cu(II), cependant sa sélectivité par rapport au Zn(II) est mauvaise comme on pouvait s'y attendre [80]. Le remplacement du carboxylate par des fonctions thioéther plus molles (**Gd12**, **Figure I. 16**) transforme la molécule en un agent de contraste responsif au Cu(I) et au Cu(II) avec une très bonne sélectivité par rapport au Zn(II), Ca(II) et Mg(II) et une bonne affinité de l'ordre du pM pour le cuivre. La détection de ce dernier entraîne une augmentation de 360% de la relaxivité due à la variation du nombre d'hydratation du Gd(III) [82].

La substitution des bras acétate par des bras hexanedioate donne **Gd14** (**Figure I. 16**), dont la réponse relaxométrique n'est pas affectée par la présence d'anions physiologiques tels que le lactate ou le carbonate [83]. Le système a une affinité très élevée pour Cu(I), $\text{Log}K_{\text{Cu}} = 13.1$, mais dans ce cas particulier, l'augmentation de la relaxivité a été attribuée à une augmentation du temps de corrélation global du complexe et non à une modification du nombre d'hydratation. Ce complexe peut détecter les différences de cuivre dans la gamme μM . Par exemple, si l'on considère une concentration typique de 100 μM de l'agent de contraste, des concentrations de Cu(I) aussi faibles que 2 μM pourraient théoriquement être détectées, bien qu'aucune étude *in vivo* n'ait été effectuée et que l'administration intracellulaire de l'agent reste problématique.

Pour détecter sélectivement le Cu(II), un cation qui est plus dur sur l'échelle de Pearson, la conception d'une fraction chélatante composée de fonctions carboxylate et thioéther **Gd13** a été envisagée (**Figure I. 16**), mais l'agent n'était pas sélectif vis-à-vis du Cu(I) [82]. Une détection réussie et sélective de Cu(II) a été obtenue en utilisant un groupement 8-amidoquinoléine **Gd15** (**Figure I. 16**), bien que la molécule n'ait pas été optimisée en termes de réponse anionique et de sensibilité de détection [84].

3.2.2. Détection du Zn(II)

3.2.2.1. Contexte

Le zinc(II) est un oligoélément indispensable pour l'organisme. Il intervient comme catalyseur dans l'activité de plusieurs enzymes. Il peut entrer dans leur structure, jouer un rôle de régulation, d'activation ou avoir plusieurs de ces rôles en même temps. La plupart du Zn(II) biologique intervient dans des éléments structuraux et catalytiques essentiels pour l'architecture des métalloprotéines et joue un rôle important dans l'équilibre physiologique, mais également dans la transcription génique. Par exemple, il intervient dans une grande variété de processus métaboliques, y compris la synthèse ou la dégradation des glucides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques [50], [78], [85]. Le Zn(II) est indispensable au fonctionnement des carboxypeptidases pancréatiques, la phosphatase alcaline, diverses déshydrogénases ou encore la superoxyde-dismutase.

Le Zn(II) se trouve sous deux formes dans l'organisme : le Zn(II) statique qui est étroitement lié à diverses métalloprotéines et le Zn(II) mobile. De nos jours, la distribution quantitative du zinc ainsi que son rôle exact dans le cerveau, le pancréas et dans la prostate sont peu connus. Et pourtant, il a été démontré que des perturbations dans l'homéostasie de Zn(II) sont impliquées dans différentes maladies [86], [87], [88], [89], [90], [91].

Il est le deuxième métal de transition le plus abondant dans l'organisme après le fer et on le trouve en grande quantité dans le cerveau (jusqu'à 300 μM dans les vésicules de certaines cellules neuronales glutamatergiques) [92]. Il joue un rôle crucial dans la transmission des informations au niveau du cerveau. En outre, il interagit avec de nombreux types de canaux ioniques [93], [94]. Les fortes concentrations et la mobilité du zinc libre dans le cerveau nécessitent une homéostasie bien contrôlée. Un aperçu de l'homéostasie du Zn(II) dans les neurones du cerveau est résumé dans la **figure I. 17**. Cette image illustre le neurone pré-synaptique qui séquestre le Zn(II) dans les vésicules synaptiques et son partenaire post-synaptique. Du point de vue neuropathologique, bien que le zinc ionique soit considéré comme modulateur endogène de l'activité synaptique et de la fonction neuronale, l'exposition incontrôlée à une grande quantité Zn(II) labile

peut conduire à la mort neuronale excitotoxique. Ce type de mort cellulaire arrive lors des crises d'épilepsie, de traumatisme crânien, d'ischémie cérébrale et de perfusion, mais aussi dans des situations liées à une activité neuronale très intense [95],[96],[97]. Malgré les tentatives d'explication du rôle que joue le Zn(II) labile dans les neurones par plusieurs laboratoires, beaucoup de questions restent sans réponse.

Il est également maintenant communément admis que le Zn(II) contribue à la formation de plaques β -amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer [98].

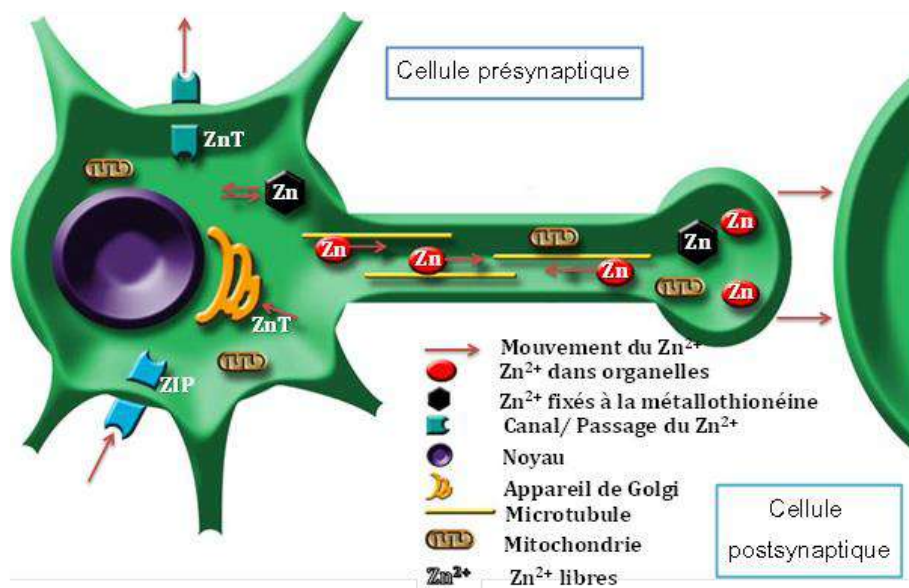


Figure I. 17 : Schéma illustrant les mouvements potentiels du Zn(II) dans le neurone présynaptique glutamatergique. Les mouvements d'arrivées et de sorties du Zn(II) qui ont lieu dans le corps cellulaire. À partir de là, le Zn(II) intracellulaire est lié à la métallothionéine ou séquestré dans les organelles cytoplasmiques. Les mécanismes de transport sont probablement responsables de la séquestration organelle du Zn(II) libre. Les organelles peuvent être le mitochondrie ou les vésicules synaptiques matures (Image adaptée de celle de Frederickson, 1989) [99].

Plusieurs scientifiques ont montré l'implication du Zn(II) dans le diabète également [90]. En effet, il est co-relargué avec l'insuline et lui permet de maintenir son activité. La diminution de sa concentration est donc impliquée dans le diabète de type 2 [100].

Comme indiqué précédemment, le zinc est également impliqué dans divers cancers dont celui de la prostate [101]. La prostate contient la plus forte concentration de zinc de tous les tissus mous et sécrète des quantités élevées de Zn(II) dans le liquide prostatique [101].

Les concentrations de zinc dans les tissus malins de la prostate sont d'environ 3 à 10 fois supérieure à celles dans les prostates saines, ce qui suggère que des concentrations élevées de zinc peuvent être essentielles pour le maintien d'une prostate saine [102]. Bien que les résultats des études épidémiologiques aient été mitigés quant à l'association entre l'apport en zinc et le risque de cancer de la prostate, les preuves expérimentales suggèrent fortement que le zinc joue un rôle dans les fonctions des cellules prostatiques et leur survie. Cependant, les fonctions spécifiques du Zn(II) dans la prostate et les mécanismes par lesquels le zinc maintient la santé de la prostate ne sont toujours pas claires.

3.2.2.2. Méthodes traditionnelles pour la détection de Zn(II)

Le Zn(II) est difficile à détecter par des techniques classiques non invasives car il est rédox silencieux, diamagnétique et sa couche électronique externe est saturée (configuration électronique $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$). Une détection indirecte par des chélatants est donc souvent privilégiée.

D'une manière générale, le zinc peut être détecté par différentes méthodes analytiques, telles que la Spectroscopie d'Absorption Atomique (SAA), spectrométrie d'émission atomique avec plasma couplé par induction (ICP-AES) et spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). D'autres méthodes telles que celle utilisant des capteurs chimiques ainsi que des radiotraceurs peuvent également conduire à la détection du Zn(II) [103], [104]. L'avantage de ces trois premières techniques, est qu'elles permettent d'analyser les métaux même à des faibles quantités, de l'ordre du ppm (ng/L) pour l'ICP-MS. Cependant, elles sont destructrices, coûteuses et ne sont pas applicables *in vivo*. Dans le domaine de la biologie, la SAA a été utilisée pour suivre la libération de Zn(II) dans le liquide extracellulaire après stimulation neuronale, mais cette technique est limitée par la destruction de l'échantillon. En outre, les deux techniques (SAA et techniques de traçage radioactives) sont incapables de faire la distinction entre les pools du zinc labiles et liés. En raison de ces facteurs, des méthodes histochimiques ont commencé à être utilisées pour la détection du zinc. Et dans ce domaine, Maske a été le premier à utiliser le dithizone comme indicateur coloré pour la

détection du Zn(II) labile dans divers tissus du corps. Grâce à cette technique, il a présenté la première preuve de l'existence de différents pools de Zn(II) dans le cerveau [105], [106], [107]. Le dithiozone est un colorant sélectif du zinc, cependant il est sensible à des facteurs environnementaux tels que la lumière, le solvant, ainsi que la chaleur. C'est ainsi que la coloration de Timm est apparue. Cette dernière est une méthode alternative à la colorimétrie avec une plus grande sensibilité au Zn(II) dans des échantillons biologiques. La méthode originale n'est pas sélective pour le Zn(II) cependant elle a été modifiée en 1984 par Danscher et ses collaborateurs pour donner une sonde sélective au Zn(II). En 2013, Zhang *et al.* ont proposé une nouvelle sonde pour la détection sélective du Zn(II) bâtie sur des complexes de ferrocène ayant un groupement bipyridine capable de complexer les ions Zn(II) [108].

L'utilisation des biosenseurs pour la détection *in vivo* nécessite l'utilisation des sondes sélectives pour Zn(II) et biocompatibles.

Aujourd'hui, le Zn(II) dans des conditions physiologiques est principalement détecté par des techniques optiques utilisant des sondes organiques fluorescentes. Deux principales limites sont inhérentes à cette technique :

- très souvent, les sondes ont besoins d'être excité dans le domaine de l'UV, ce qui n'est pas compatible avec les applications biologiques, même si des efforts ont récemment été faits pour diminuer l'énergie d'excitation.
- les photons visibles ou même proche infrarouge pénètrent seulement quelques mm à quelques cm dans les tissus, ce qui limite cette technique à l'imagerie de surface ou des études cellulaires.

Concevoir et valider les nouvelles sondes d'imagerie non invasives efficaces pour la détection quantitative du Zn(II) est primordial. Au cours de ces dernières années, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a été signalée comme une technique prometteuse pour la détection du Zn(II).

3.2.2.3. Détection du Zn(II) par IRM

L'importance que revêt la détection du Zn(II) dans la compréhension de différentes maladies a conduit à la conception de nouveaux agents de contraste sensibles au Zn(II). Sa détection en IRM est basée sur une variation du nombre d'hydratation des complexes de Gd(III), en présence ou en absence du Zn(II), mais aussi du temps de corrélation rotationnel. La conception de ligands pour la détection du Zn(II) repose principalement sur le motif DTPA ou DOTA à laquelle une partie complexante du Zn(II) a été ajoutée. Cette dernière peut comporter soit des fonctions iminodiacétate [109], soit plus souvent un motif DPA (bis-(2-pyridineméthyl)amine) [110] car ce dernier possède une bonne affinité ($K_d \sim 25$ nM) et une bonne sélectivité pour le Zn(II).

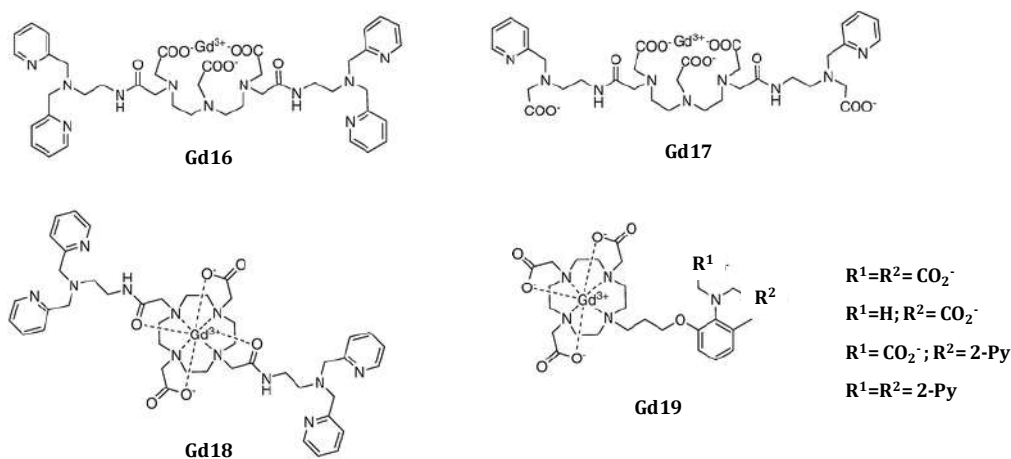


Figure I. 18 : Agents de contraste IRM pour la détection de Zn(II) développés par Nagano, Meade et Sherry [111], [112], [113], [114], [115].

Dans ce but, Nagano *et al.* ont développé les complexes **Gd16** et **Gd17** présentés dans la **figure I. 18** comportant deux motifs DPA ou deux analogues carboxylés greffés au GdDTPA [111], [112]. Ces agents de contraste montrent une diminution de la relaxivité lors d'un ajout d'un équivalent de Zn(II) qui entraîne un rapprochement de deux bras DPA ou DPA modifiés pour complexer le Zn(II) et bloquent l'accès de la molécule d'eau au Gd(III). Toutefois, dans le cas de **Gd16**, l'ajout du deuxième équivalent de Zn(II) induit une augmentation de la relaxivité jusqu'à atteindre sa valeur initiale. Une explication possible pour le comportement observé est que lorsque plus de 1 équivalent de Zn(II) est ajouté, chaque unité complexante de Zn(II) lie ce dernier, le centre Gd(III) devient à nouveau accessible par les molécules d'eau. Par conséquent, dans **Gd17**, la

partie complexante de Zn(II) (DPA) a été modifiée. Un groupe picolyle a été remplacé par un groupe acétate. La réponse au Zn(II) devient monotone avec diminution de la relaxivité après l'ajout du deuxième équivalent de Zn(II), ce qui est sans doute dû à une diminution du nombre de molécules d'eau sur le Gd(III). Par ailleurs, ces deux agents de contraste montrent une bonne sélectivité pour le zinc vis-à-vis du Mg(II) et du Ca(II), avec cependant, une réponse au cuivre.

Meade et ses collaborateurs ont également développé des agents de contraste à base de Gd-DOTA et comportant différents substituants pour la complexation de Zn(II) (**Figure I. 18 Gd19**) [114], [113], [115].

En fonction des substituants utilisés pour la détection de Zn(II), ces agents ont montré des augmentations de la relaxivité. Notamment, pour le complexe contenant un groupe iminodiacétate, une augmentation de la relaxivité de 122% associée à un changement de q ainsi qu'une constante d'affinité $K_{dZn(II)}$ de 240 mM ont été obtenues. Une bonne sélectivité pour le Zn(II) par rapport au Ca(II) et au Mg(II) a été observée, cependant, une réponse au Cu(II) a également été enregistrée.

L'agent le plus réussi jusqu'à présent, et qui a prouvé la faisabilité de la détection du Zn(II) par IRM *in vivo*, est un complexe GdDOTA-bisamide comportant deux bras DPA (**Figure I. 18 Gd18 et Figure I. 19**) [115] développé par Sherry, l'un des pionniers dans le domaine de l'imagerie moléculaire. Ici, le mécanisme de la modulation de relaxivité est basé sur un changement du temps de corrélation rotationnelle global du complexe.

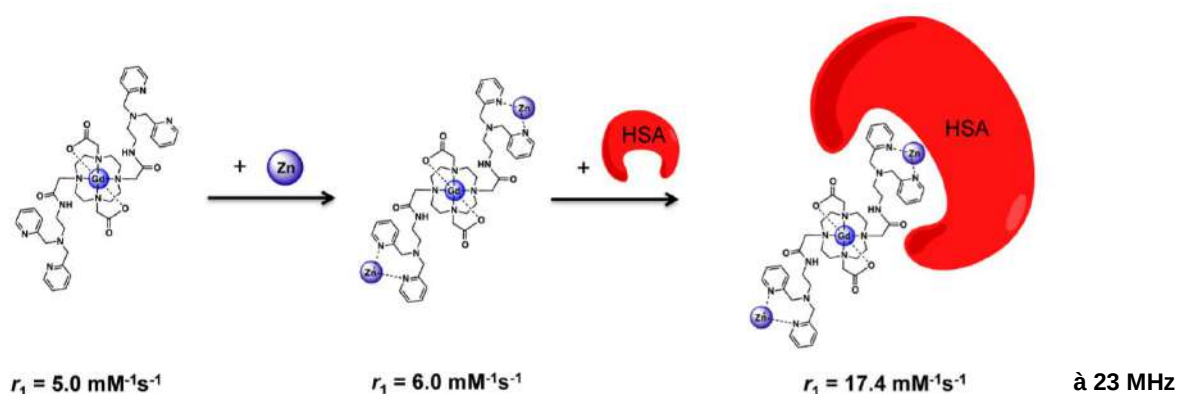


Figure I. 19 : Agent de contraste responsive au zinc avec une modulation de temps de corrélation rotationnel [115].

Ceci résulte de l'affinité de liaison de HSA avec le complexe qui est différente suivant la présence de Zn(II) ou non. En l'absence de Zn(II), le complexe interagit faiblement avec la HSA, alors qu'en présence de ce cation métallique, cette interaction est accentuée. Cette augmentation de l'interaction se traduit directement par une augmentation du temps de corrélation de rotationnelle et donc une augmentation de la relaxivité (**Figure I. 19**).

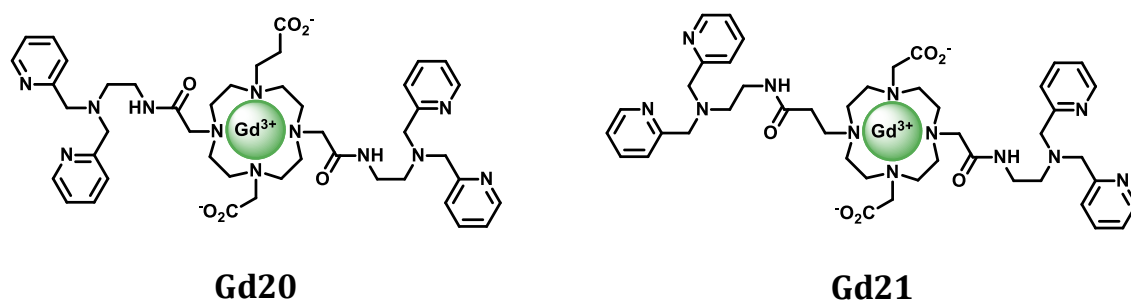


Figure I. 20 : Sondes optimisées pour une réponse au Zn(II) en présence de HSA [116].

D'autres améliorations ont été apportées en termes de vitesse d'échange par Sherry *et al.* [116] compte tenu des limitations connues du taux d'échange de molécules d'eau du GdDOTA-diBPEN (**Gd18**). Ces nouvelles sondes présentent des propriétés d'échange d'eau optimisées et démontrent des relaxivités longitudinales significativement améliorées (r_1) selon leur structure individuelle. En particulier, les deux sondes **Gd20** et **Gd21** (**Figure I. 20**) démontrent des paramètres optimisés et, par conséquent, présentent des relaxivités longitudinales exceptionnellement élevées d'environ $50 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ lors de la détection de Zn(II) et en présence de la HSA (soit 3 fois la valeur obtenue pour la sonde d'origine, GdDOTA-diBPEN).

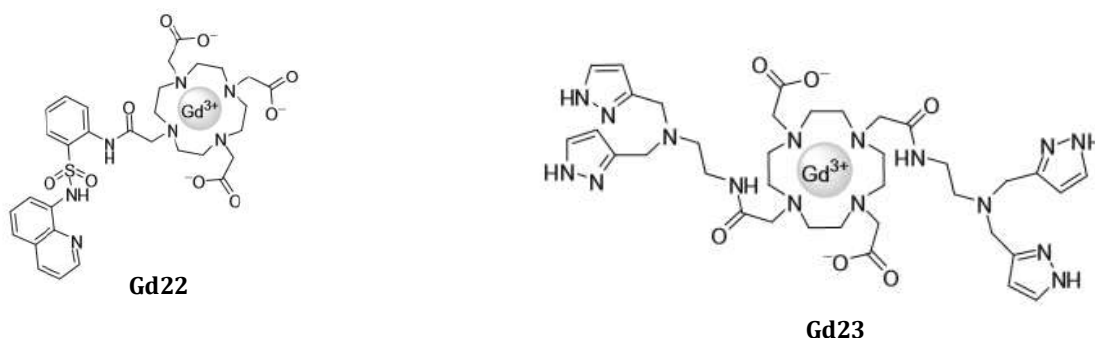


Figure I. 21 : Exemples de sondes pour la détection du Zn(II) avec des unités complexantes différentes de la DPA [84], [117].

Des unités complexantes de Zn(II) telles que le 3-pyrazonyl (**Gd23**) [117] et le 8-sulfonamidoquinoline (**Gd22**) [118] (**Figure I. 21**) ont également été testées afin de moduler l'affinité pour le Zn(II). **Gd22** porte un chromophore, par conséquent ce complexe a été proposé comme sonde bimodale pour l'IRM et l'imagerie optique. Une formation des espèces **Gd22₂Zn** avec une affinité aux alentours de pM a été observée pour le complexe ayant la fonction sulfonamide en position *para* [119]. Cette modulation de l'affinité au zinc devrait permettre de détecter une large gamme de concentration de Zn(II), ce qui est crucial pour obtenir une idée plus précise de l'homéostasie du zinc *in vivo*. Cependant, il est toujours important de faire attention à utilisation des sondes à plus haute affinité pour ne pas perturber l'homéostasie du zinc.

En ce qui concerne les applications *in vivo* des agents de contraste pour la détection du Zn(II) seuls les complexes **Gd18**, **Gd20** et **Gd21** développés par Sherry *et al.* ont fait leurs preuves. Par exemple, le complexe **Gd18** a été utilisé *in vivo* pour imager des cellules β à partir de pancréas de souris [120]. C'est le premier exemple d'agent de contraste pour la détection du Zn(II) allant jusqu'à des applications *in vivo*. En effet, comme il a été décrit précédemment, le Zn(II) est associé à l'insuline dans les cellules β du pancréas et co-relargué en réponse à des taux élevés de glucose. Dans cette expérience, le contraste de l'image a été considérablement amélioré dans le pancréas de souris après injection de glucose et **Gd18**, alors qu'en l'absence de glucose, aucune amélioration n'a été observée. Cela démontre bien que les sondes pour la détection de Zn(II) peuvent potentiellement être des outils très utiles pour détecter la progression du diabète de type 2. De même, les complexes **Gd20** et **Gd21** ont été utilisés pour suivre *in*

vivo avec succès la libération de Zn(II) du pancréas de souris lors de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose [116].

Sherry et ses collaborateurs ont montré la possibilité de détecter un cancer de la prostate via la détection de Zn(II) [121]. Ils ont démontré que la sécrétion de Zn(II) provenant d'un tissu de prostate sain est stimulée par le glucose chez les souris à jeûne et que cette libération peut être contrôlée en IRM. Les images IRM ont montré que chez des animaux sains, un contraste amélioré de l'image IRM a été observé après la stimulation par le glucose et administration de GdDOTA-diBPEN. À l'inverse, chez les souris atteintes d'une tumeur prostatique, le contraste de l'IRM n'a pas été amélioré suite à l'injection du GdDOTA-diBPEN car dans ces tissus malades, la sécrétion de Zn(II) est diminuée. Ces résultats ont confirmé que la perte attendue de la sécrétion de Zn(II) dans les lésions malignes de la prostate pourrait être surveillée *in vivo* en utilisant l'IRM et le GdDOTA-diBPEN a permis de détecter de petites lésions à un stade très précoce de 11 semaines.

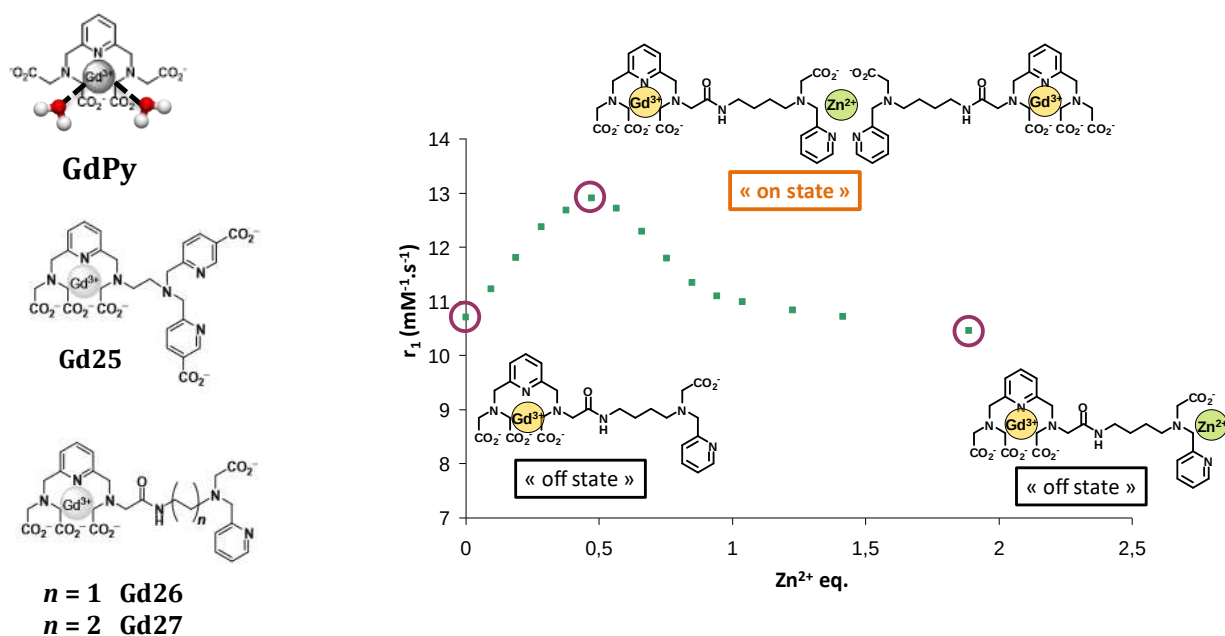


Figure I. 22 : Evolution de la relaxivité du complexe [Gd27] = 0,5 mM (HEPES 0,1M) en présence de Zn(II) à 20 MHz et à 298 K [122].

Au laboratoire, nous nous sommes également intéressés à la détection du Zn(II) par IRM. Une série de sondes basées sur un motif pyridine comme partie complexante de Gd(III) ont été développées (**GdPy**, **Figure I. 22**) [122]. En effet, il a été démontré que le complexe Gd(III) bishydraté (**GdPy**) possède des propriétés IRM optimisées en raison de ses deux molécules d'eau en première sphère de coordination, tout en conservant une bonne stabilité thermodynamique et cinétique [123]. En outre, une formation de complexes ternaires avec des anions physiologiques n'a pas été observée [124]. En ce qui concerne le site de complexation du zinc, des dérivés de la DPA ont été choisis. Les complexes comportent donc une unité DPA sur laquelle une modification a été apportée en introduisant des fonctions carboxylate soit à la place d'une pyridine du DPA (**Gd26-Gd27**), soit sur la pyridine du DPA (**Gd25**).

Tout d'abord, il a été démontré que la présence de l'amide sur le linker est nécessaire pour assurer la stabilité du complexe Gd(III) en présence de Zn(II). Ceci a été confirmé par des études potentiométriques sur un composé modèle, imitant la sphère de coordination de Gd(III) dans **Gd25** en présence de Zn(II).

Pour les composés **Gd26** et **Gd27**, les études ont montré un changement de relaxivité maximum d'environ 20% par ajout de 0,5 équivalent de Zn(II). Ensuite, la relaxivité diminue après addition supplémentaire de Zn(II). D'autres études ont montré que les valeurs q et le k_{ex} ne sont pas affectées par la présence de Zn(II), alors que les coefficients de diffusion le sont. Cela reflète la formation d'une espèce dimérique, ce qui est également mis en évidence par RMN du proton. Un ajustement simultané des données RMN ^{17}O et des profils ^1H NMRD a révélé sans ambiguïté que les changements de relaxivité observés sont dus à la formation de ces espèces bis-chélate dotées d'un temps de corrélation rotationnel élevé. Une bonne sélectivité au Zn(II) par rapport à d'autres cations physiologiques a été également observée. Cela signifie que l'unité complexante de Zn(II) (DPA modifiée) est bien adaptée pour cette application.

Cependant, pour une utilisation *in vivo* de ces systèmes, leur stabilité doit être améliorée. Plus important encore, une variation monotone de la relaxivité avec l'ajout de Zn(II) doit obligatoirement être obtenue pour toute quantification.

3.3. Quantification des paramètres physiologiques

3.3.1. Problématique

Malgré les développements importants dans le domaine de la quantification des sondes responsives, un certain nombre de problématiques restent à résoudre. Parmi eux, un problème majeur reste la quantification du biomarqueur.

En effet, le signal IRM dépend non seulement de la réponse au biomarqueur, mais aussi de la concentration de la sonde d'imagerie utilisée. Peu de tentatives ont été faites pour s'attaquer à la problématique de la quantification de la sonde.

Aujourd'hui, il n'existe que quelques exemples de quantification pour la détermination du pH.

3.3.2. Méthodes utilisées

Une première méthode pour la quantification du pH a été proposée par Aime *et al.* [125]. Il s'agit d'une méthode ratiométrique permettant de suivre le ratio R_{2p}/R_{1p} où R_{2p} et R_{1p} correspondent aux augmentations paramagnétiques de taux de relaxation transversale et longitudinale des protons de l'eau. La faisabilité *in vivo* de cette technique n'a toutefois pas été prouvée étant donné que R_{2p} est relativement élevé dans les tissus vivants par rapport à R_{1p} .

Une deuxième méthode consiste à co-injecter deux sondes, une dépendante et l'autre indépendante du paramètre à détecter (voir ci-dessus). Cette dernière a permis d'élaborer une cartographie des valeurs de pH *in vivo* dans l'acidose rénale et les modèles de la tumeur cérébrale [67], [65]. Cependant, cette technique s'appuie sur l'hypothèse que le comportement pharmacocinétique des deux sondes est identique. Ceci est une forte limitation car même avec de petits changements de la structure moléculaire de ces agents, des différences dramatiques sur leur biodistribution peuvent être observées [126].

Enfin, des méthodes basées sur la bimodalité existent. En effet, il paraît intéressant de tirer parti des avantages de différentes techniques d'imagerie, dont certaines sont quantitatives (comme les techniques d'imagerie nucléaires) et d'autres sont responsives (comme l'IRM). Dans ce cadre, Caravan *et al.* ont développé un agent bimodal IRM-TEP pour l'imagerie quantitative du pH. Pour cela, ils ont incorporé un atome de fluor dans un complexe de Gd(III) responsif au pH (**Gd5**, **Figure I. 13**), le fluor étant soit du ^{18}F (détectable en TEP), soit du ^{19}F . Ensuite, un mélange de ces deux complexes en proportion respectant les différences de sensibilité entre les deux techniques utilisées a été préparé. Ils ont ainsi démontré qu'il est possible de quantifier le pH *in vitro* [127]. Cette méthode nécessite toutefois la modification du ligand afin d'introduire un élément radioactif.

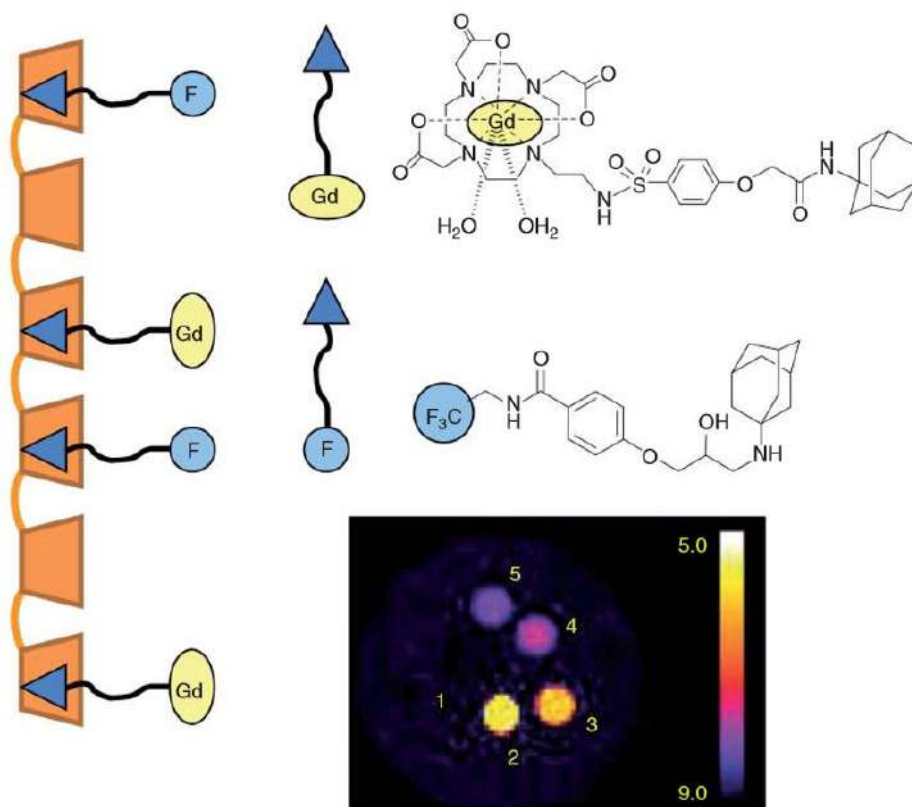


Figure I. 23 : Représentation du produit de contraste pour la détection quantitative du pH [128].

Dans une approche similaire, mais en utilisant l'IRM couplée avec la RMN du ^{19}F , un complexe de Gd(III) a été fonctionnalisé avec une unité adamantane connue pour sa

forte interaction avec la cavité de la β -cyclodextrin (**Figure I. 23**) [128]. Une autre molécule comportant une fonction $-\text{CF}_3$ incorporée sur la fonction adamantane a également été développée. Un mélange de ces deux composés (en tenant compte de rapport molaire approprié des substrats) a permis d'accéder au pH par IRM en utilisant la RMN du ^{19}F . Des images *in vitro* ont également été enregistrées après normalisation du signal. Cependant, cette approche est limitée par la difficulté de la conception des sondes.

Aime et ses collaborateurs ont proposé de remplacer le Gd(III) par un autre Ln(III) actif en TEMP. En effet, ils se sont appuyés sur la similarité chimique entre les différents Ln(III) pour dire que les complexes auront des propriétés similaires. Cette dernière méthode présente l'avantage d'une conception simplifiée du chélate, puisque les deux complexes ne diffèrent que par l'ion Ln(III) . Les complexes sont ensuite utilisés comme précédemment, dans des proportions respectant les sensibilités des deux techniques. Dans leur exemple, ils ont choisi l' $^{166}\text{Ho(III)}$ pour le TEMP [129]. Cet isotope a un temps de demi-vie de 26.6 h, qui n'est pas forcément optimal pour une application pratique. D'autre part, pour des raisons techniques, ils ont dû utiliser environ 15 mM de complexe d' Ho(III) afin d'obtenir des quantités de $^{166}\text{Ho(III)}$ détectable. Cette méthode reste donc applicable *in vitro* pour la détection du pH, mais ne l'est absolument pas pour de la détection de cations par exemple car les quantités d'agents de contraste à utiliser sont beaucoup trop importantes en comparaison des quantités de cations visées. Un autre inconvénient de ce système est la formation possible de complexes ternaires avec des anions endogène limitant la réponse IRM dans des conditions réelles car il est basé sur du DO3A pour la complexation de Gd(III) [130], [131].

Aujourd'hui, ce sont les seuls exemples proposés pour la détection quantitative de paramètres physiologiques et aucun d'entre eux n'a été développé pour la détection des cations, alors que comme nous l'avons vu leur quantification par des méthodes non invasives est primordiale.

4. Objectif de la thèse

L'objectif de ma thèse est donc de concevoir, synthétiser et étudier des sondes IRM sensibles au Zn(II), ainsi que de valider la quantification du Zn(II) *in vitro*.

Notre approche est d'utiliser des sondes d'imagerie bimodale avec une réponse IRM dépendante de la concentration en Zn(II) et d'exploiter une modalité quantitative d'imagerie nucléaire (TEMP), pour évaluer la concentration de l'agent de contraste IRM.

Dans cette approche, l'IRM sera utilisée comme technique responsive puisque le signal obtenu dépend de l'environnement. Le TEMP apportera sa contribution dans la quantification puisque le signal obtenu par cette technique est directement proportionnel à la concentration de sonde radioactive utilisée. Connaissant le ratio de complexe de Gd(III) et de complexe radioactif injecté, il sera alors possible de remonter localement à la concentration en Gd(III). Puis par une calibration de la réponse du complexe de Gd(III) au Zn(II), il sera alors possible de déterminer la concentration en Zn(II) locale.

Nous proposons ici de concevoir des chélates qui peuvent complexer Gd(III) pour l'IRM et un isotope de Ln(III) actif en TEMP, ici $^{165}\text{Er(III)}$ (le choix de cet isotope sera discuté dans le chapitre 5). La principale difficulté à combiner ces deux techniques est leur différence de sensibilité. Notre approche, en utilisant le même ligand et en changeant l'ion métallique en fonction de la technique d'imagerie, nous permettra de compenser aisément ces différences. En effet, les deux complexes seront mélangés dans un rapport cohérent avec les différences de sensibilité des deux techniques. Le comportement chimique similaire de ces deux complexes de Ln(III) permettra une biodistribution identique et donc une détection quantitative du cation désiré.

En outre avec l'évolution de la technologie, il existe déjà des équipements d'imagerie ayant une combinaison de l'IRM-TEMP ou IRM-TEP [132], [133], [134], [135], [136], [137]. Dans notre approche, ces techniques seront utilisées spécifiquement pour la quantification de Zn(II).

Cette approche offre d'autres avantages, tels qu'une synthèse de ligands simplifiée, une conception plus polyvalente et une manipulation minimale des éléments radioactifs.

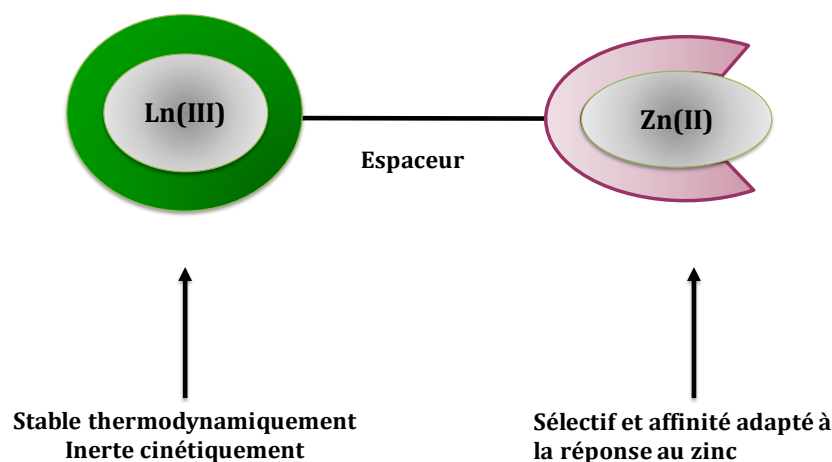


Figure I. 24 : Structure schématique de l'agent de contraste ainsi que les contraintes pour la détection de Zn(II).

Ici, les ligands seront conçus selon une approche modulaire et seront composés de trois éléments constitutifs (**Figure I. 24**) : le chélate de Ln(III), qui devra être thermodynamiquement stable, cinétiquement inerte et ne devra pas interagir avec les anions physiologiques ; l'unité complexante du Zn(II), qui devra être sélective pour le cation choisi et présenter une affinité adaptée à sa concentration physiologique ; un linker entre les deux précédentes unités. Nous nous appuierons sur les résultats précédemment obtenus au laboratoire avec les trois objectifs principaux suivants pour la conception des sondes :

- (1) Augmenter la stabilité thermodynamique des complexes de Gd(III)
- (2) Obtenir une réponse au Zn(II) monotone
- (3) Optimiser la réponse au Zn(II) en termes de différence de relaxivité entre les états avec et sans Zn(II). Pour ce dernier objectif, une compréhension complète des mécanismes responsables des différences de relaxivité sera primordiale.

Le corps de la thèse sera donc divisé en 4 chapitres. Dans le premier chapitre, nous nous attacherons à améliorer à la fois la stabilité thermodynamique des complexes de Gd(III) déjà développés, et à modifier le complexant du Zn(II) pour obtenir une réponse monotone. Le deuxième chapitre s'intéressera à la détermination fine des paramètres gouvernant la réponse au Zn(II) en présence de HSA. Nous nous efforcerons de trouver

des relations structure/réponse afin d'améliorer la compréhension de ces systèmes. Le troisième chapitre s'intéressera à la réponse au Zn(II) par variation du nombre d'hydratation du Gd(III) et enfin le dernier chapitre concernera la quantification du Zn(II) *in vitro* par imagerie bimodale.

5. Bibliographie

1. Bunzli, J.C. Benefiting from the unique properties of lanthanide ions. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 53-61, doi:10.1021/ar0400894.
2. Lucas, J.; Lucas, P.; Le Mercier, T.; Rollat, A.; Davenport, W.G. *Rare earths: science, technology, production and use*; Elsevier: 2014; 10.1016/B978-0-444-62735-3.00005-X.
3. Buchler, J.W.; De Cian, A.; Fischer, J.; Kihn-Botulinski, M.; Paulus, H.; Weiss, R. Metal complexes with tetrapyrrole ligands. 40. Cerium (IV) bis (octaethylporphyrinate) and dicerium (III) tris (octaethylporphyrinate): parents of a new family of lanthanoid double-decker and triple-decker molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3652-3659.
4. Garcia, J.; Kuda-Wedagedara, A.N.; Allen, M.J. Physical Properties of Eu²⁺-Containing Cryptates as Contrast Agents for Ultrahigh-Field Magnetic Resonance Imaging. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 2135-2140.
5. Josse, M.; Dubois, M.; El-Ghozzi, M.; Avignant, D. Synthesis and crystal structures of new mixed-valence terbium (III/IV) fluorides with a random distribution between Tb³⁺ and Tb⁴⁺. *J. Alloys Compd.* **2004**, *374*, 213-218.
6. Du, Z.; Zhang, Y.; Yao, Y.; Shen, Q. Synthesis and molecular structure of piperazine-bridged bis (phenolate) samarium (II) complex and its reactivity to carbodiimides. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7639-7644.
7. Shannon, R.T.; Prewitt, C.T. Effective ionic radii in oxides and fluorides. *Acta Crystallogr.B* **1969**, *25*, 925-946.
8. Pearson, R.G. Hard and soft acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533-3539.
9. Moulin, N.; Hussonnois, M.; Brillard, L.; Guillaumont, R. Fonctions thermodynamiques de complexes halogénés de Sm, Eu, Gd, Tb et Dy. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1975**, *37*, 2521-2524.
10. Choppin, G.R. Lanthanide complexation in aqueous solutions. *J. Less Common Metals* **1984**, *100*, 141-151.
11. Lucas, J.; Lucas, P.; Le Mercier, T.; Rollat, A.; Davenport, W. Introduction to Rare Earth Luminescent Materials. In *Rare Earths, Science, Technology, Production and Use*, 1st ed., Elsevier: Amsterdam, 2015.
12. Uh, H.; Petoud, S. Novel antennae for the sensitization of near infrared luminescent lanthanide cations. *C. R. Chim.* **2010**, *13*, 668-680.
13. Bunzli, J.C.; Piguet, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048-1077, doi:10.1039/b406082m.

14. Werts, M.H. Making sense of lanthanide luminescence. *Sci. Prog.* **2005**, *88*, 101-131.
15. Tanner, P.A. Lanthanide luminescence in solids. In *Lanthanide Luminescence*, Springer: 2010; pp. 183-233.
16. Moore, E.G.; Samuel, A.P.; Raymond, K.N. From antenna to assay: lessons learned in lanthanide luminescence. *Accounts of chemical research* **2009**, *42*, 542-552.
17. Alpha, B.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Lehn, J.M.; Perathoner, S.; Sabbatini, N. Antenna effect in luminescent lanthanide cryptates: a photophysical study. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 299-306.
18. Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Bolletta, F.; Manet, I.; Ziessel, R. Luminescent Eu³⁺ and Tb³⁺ Complexes of a Branched Macrocyclic Ligand Incorporating 2, 2'-Bipyridine in the Macrocycle and Phosphinate Esters in the Side Arms. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1501-1503.
19. Supkowski, R.M.; Horrocks, W.D. On the determination of the number of water molecules, q, coordinated to europium (III) ions in solution from luminescence decay lifetimes. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *340*, 44-48.
20. Quici, S.; Cavazzini, M.; Marzanni, G.; Accorsi, G.; Armaroli, N.; Ventura, B.; Barigelletti, F. Visible and near-infrared intense luminescence from water-soluble lanthanide [Tb (III), Eu (III), Sm (III), Dy (III), Pr (III), Ho (III), Yb (III), Nd (III), Er (III)] complexes. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 529-537.
21. Beeby, A.; Clarkson, I.; Dickins, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L. AS d. Sousa, JAG Williams and M. Woods. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **1999**, *2*, 493.
22. Jones, C.J. Electronic spectra and magnetism of transition element complexes. **2002**.
23. La Mar, G.; Horrocks, D.; RH, H. *NMR of paramagnetic molecules*; Academic Press: New York 1973; pp. 525.
24. Geraldes, C.F.; Laurent, S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, *4*, 1-23.
25. Aime, S.; Caravan, P. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *30*, 1259-1267.
26. Zhang, L.; Liu, R.; Peng, H.; Li, P.; Xu, Z.; Whittaker, A.K. The evolution of gadolinium based contrast agents: from single-modality to multi-modality. *Nanoscale* **2016**, *8*, 10491-10510.
27. Hermann, P.; Kotek, J.; Kubiček, V.; Lukeš, I. Gadolinium (III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes. *Dalton Trans.* **2008**, 3027-3047.
28. Young, R.M.; Jamshidi, A.; Davis, G.; Sherman, J.H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann. Transl. Med* **2015**, *3*.
29. Bloembergen, N.; Purcell, E.M.; Pound, R.V. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679.
30. Solomon, I. Relaxation processes in a system of two spins. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559.
31. Solomon, I.; Bloembergen, N. Nuclear magnetic interactions in the HF molecule. *J. Chem. Phys.* **1956**, *25*, 261-266.

32. Bloembergen, N. Proton relaxation times in paramagnetic solutions. *J. Chem. Phys.* **1957**, 27, 572-573.
33. Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A.E. Relaxivity of gadolinium(III) complexes: theory and mechanism. In *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, Second Edition*, Toth, E., Helm, L., Merbach, A.E., Eds. John Wiley & Sons: Chichester, 2013; pp. 25-76.
34. Fries, P.H.; Belorizky, E. Electronic Spin Relaxation and Outer-Sphere Dynamics of Gadolinium-Based Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, Second Edition*, Toth, E., Helm, L., Merbach, A.E., Eds. John Wiley & Sons: Chichester, 2013; pp. 277-309.
35. Caravan, P.; Ellison, J.J.; McMurry, T.J.; Laufer, R.B. Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293-2352.
36. Karfeld-Sulzer, L.S.; Waters, E.A.; Davis, N.E.; Meade, T.J.; Barron, A.E. Multivalent protein polymer MRI contrast agents: controlling relaxivity via modulation of amino acid sequence. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 1429-1436.
37. Yang, J.J.; Yang, J.; Wei, L.; Zurkiya, O.; Yang, W.; Li, S.; Zou, J.; Zhou, Y.; Maniccia, A.L.W.; Mao, H. Rational design of protein-based MRI contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9260-9267.
38. Torres, S.; Martins, J.A.; André, J.P.; Geraldès, C.F.; Merbach, A.E.; Tóth, É. Supramolecular assembly of an amphiphilic GdIII chelate: Tuning the reorientational correlation time and the water exchange rate. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 940-948.
39. Wiener, E.; Auteri, F.; Chen, J.; Brechbiel, M.; Gansow, O.; Schneider, D.; Belford, R.; Clarkson, R.; Lauterbur, P. Molecular Dynamics of Ion- Chelate Complexes Attached to Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7774-7782.
40. Paul-Roth, C.; Raymond, K.N. Amide functional group contribution to the stability of gadolinium (III) complexes: DTPA derivatives. *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 1408-1412.
41. Cacheris, W.P.; Quay, S.C.; Rocklage, S.M. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *J. Magn. Reson. Imaging* **1990**, 8, 467-481.
42. Brücher, E. Kinetic stabilities of gadolinium (III) chelates used as MRI contrast agents. In *Contrast Agents I*, Springer: 2002; pp. 103-122.
43. Sarka, L.; Burai, L.; Brücher, E. The rates of the exchange reactions between [Gd (DTPA)]²⁻ and the endogenous ions Cu²⁺ and Zn²⁺: a kinetic model for the prediction of the in vivo stability of [Gd (DTPA)]²⁻, used as a contrast agent in magnetic resonance imaging. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 719-724.
44. Moats, R.A.; Fraser, S.E.; Meade, T.J. A "smart" magnetic resonance imaging agent that reports on specific enzymatic activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 726-728.
45. Louie, A.Y.; Hüber, M.M.; Ahrens, E.T.; Rothbächer, U.; Moats, R.; Jacobs, R.E.; Fraser, S.E.; Meade, T.J. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 321-325.
46. Urbanczyk-Pearson, L.M.; Femia, F.J.; Smith, J.; Parigi, G.; Duimstra, J.A.; Eckermann, A.L.; Luchinat, C.; Meade, T.J. Mechanistic investigation of β -galactosidase-activated MR contrast agents. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 56-68.
47. Urbanczyk-Pearson, L.M.; Meade, T.J. Preparation of magnetic resonance contrast agents activated by β -galactosidase. *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 341-350.

48. Bonnet, C.S.; Tóth, É. Chapter Two-Molecular Magnetic Resonance Imaging Probes Based on Ln 3+ Complexes. *Adv. Inorg. Chem.* **2016**, *68*, 43-96.
49. Heffern, M.C.; Matosziuk, L.M.; Meade, T.J. Lanthanide probes for bioresponsive imaging. *Chem. Rev* **2014**, *114*, 4496-4539.
50. Bonnet, C.S.; Tóth, É. MRI probes for sensing biologically relevant metal ions. *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 367-384.
51. Duimstra, J.A.; Femia, F.J.; Meade, T.J. A gadolinium chelate for detection of β -glucuronidase: a self-immolative approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12847-12855.
52. Bogdanov Jr, A.; Matuszewski, L.; Bremer, C.; Petrovsky, A.; Weissleder, R. Oligomerization of paramagnetic substrates result in signal amplification and can be used for MR imaging of molecular targets. *Molecular imaging* **2002**, *1*, 16-23.
53. Chen, J.W.; Pham, W.; Weissleder, R.; Bogdanov, A. Human myeloperoxidase: a potential target for molecular MR imaging in atherosclerosis. *Magn. Reson. Med.* **2004**, *52*, 1021-1028.
54. Querol, M.; Bennett, D.G.; Sotak, C.; Kang, H.W.; Bogdanov, A. A paramagnetic contrast agent for detecting tyrosinase activity. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1637-1641.
55. Querol, M.; Chen, J.W.; Weissleder, R.; Bogdanov, A. DTPA-bisamide-based MR sensor agents for peroxidase imaging. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1719-1722.
56. Aime, S.; Cabella, C.; Colombatto, S.; Geninatti Crich, S.; Gianolio, E.; Maggioni, F. Insights into the use of paramagnetic Gd (III) complexes in MR-molecular imaging investigations. *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, *16*, 394-406.
57. Nivorozhkin, A.L.; Kolodziej, A.F.; Caravan, P.; Greenfield, M.T.; Lauffer, R.B.; McMurry, T.J. Enzyme-Activated Gd3+ Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents with a Prominent Receptor-Induced Magnetization Enhancement. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2903-2906.
58. Napolitano, R.; Pariani, G.; Fedeli, F.; Baranyai, Z.; Aswendt, M.; Aime, S.; Gianolio, E. Synthesis and relaxometric characterization of a MRI Gd-based probe responsive to glutamic acid decarboxylase enzymatic activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2466-2477.
59. Stubbs, M.; Bhujwalla, Z.; Tozer, G.; Rodrigues, L.; Maxwell, R.; Morgan, R.; Howe, F.; Griffiths, J. An assessment of ³¹P MRS as a method of measuring pH in rat tumours. *NMR Biomed.* **1992**, *5*, 351-359.
60. Raghunand, N.; Altbach, M.I.; Van Sluis, R.; Baggett, B.; Taylor, C.W.; Bhujwalla, Z.M.; Gillies, R.J. Plasmalemmal pH-gradients in drug-sensitive and drug-resistant MCF-7 human breast carcinoma xenografts measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Biochem. Pharmacol* **1999**, *57*, 309-312.
61. Raghunand, N.; Mahoney, B.; van Sluis, R.; Baggett, B.; Gillies, R.J. Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* **2001**, *3*, 227-235.
62. Pérez-Mayoral, E.; Negri, V.; Soler-Padrós, J.; Cerdán, S.; Ballesteros, P. Chemistry of paramagnetic and diamagnetic contrast agents for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy: pH responsive contrast agents. *Eur. J. Radiol.* **2008**, *67*, 453-458.

63. De Leon-Rodriguez, L.M.; Lubag, A.J.M.; Malloy, C.R.; Martinez, G.V.; Gillies, R.J.; Sherry, A.D. Responsive MRI agents for sensing metabolism in vivo. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 948-957.
64. Zhang, X.; Lin, Y.; Gillies, R.J. Tumor pH and its measurement. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1167-1170.
65. Raghunand, N.; Howison, C.; Sherry, A.D.; Zhang, S.; Gillies, R.J. Renal and systemic pH imaging by contrast-enhanced MRI. *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 249-257.
66. Zhang, S.; Wu, K.; Sherry, A.D. A novel pH-sensitive MRI contrast agent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3192-3194.
67. Garcia-Martin, M.L.; Martinez, G.V.; Raghunand, N.; Sherry, A.D.; Zhang, S.; Gillies, R.J. High resolution pHe imaging of rat glioma using pH-dependent relaxivity. *Magn. Reson. Med.* **2006**, *55*, 309-315.
68. Beto, J.A. The role of calcium in human aging. *Clin. Nutr. Res.* **2015**, *4*, 1-8.
69. Li, W.-h.; Fraser, S.E.; Meade, T.J. A calcium-sensitive magnetic resonance imaging contrast agent. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1413-1414.
70. Li, W.-h.; Parigi, G.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Meade, T.J. Mechanistic studies of a calcium-dependent MRI contrast agent. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 4018-4024.
71. Tsien, R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochem* **1980**, *19*, 2396-2404.
72. Cai, K.; Haris, M.; Singh, A.; Kogan, F.; Greenberg, J.H.; Hariharan, H.; Detre, J.A.; Reddy, R. Magnetic resonance imaging of glutamate. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 302-306.
73. Dhingra, K.; Fousková, P.; Angelovski, G.; Maier, M.E.; Logothetis, N.K.; Tóth, E. Towards extracellular Ca²⁺ sensing by MRI: synthesis and calcium-dependent ¹H and ¹⁷O relaxation studies of two novel bismacrocylic Gd³⁺ complexes. *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 35-46.
74. Mishra, A.; Fousková, P.; Angelovski, G.; Balogh, E.; Mishra, A.K.; Logothetis, N.K.; Tóth, É. Facile synthesis and relaxation properties of novel bispolyazamacrocyclic Gd³⁺ complexes: an attempt towards calcium-sensitive MRI contrast agents. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 1370-1381.
75. Angelovski, G.; Fouskova, P.; Mamedov, I.; Canals, S.; Toth, E.; Logothetis, N.K. Smart magnetic resonance imaging agents that sense extracellular calcium fluctuations. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1729-1734.
76. Mamedov, I.; Logothetis, N.K.; Angelovski, G. Structure-related variable responses of calcium sensitive MRI probes. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5816-5824.
77. Dhingra, K.; Maier, M.E.; Beyerlein, M.; Angelovski, G.; Logothetis, N.K. Synthesis and characterization of a smart contrast agent sensitive to calcium. *Chem. Commun.* **2008**, 3444-3446.
78. Que, E.L.; Domaille, D.W.; Chang, C.J. Metals in neurobiology: probing their chemistry and biology with molecular imaging. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1517-1549.
79. Iijima, M.; Yonemochi, Y.; Tsukada, M.; Kamiya, H. Microstructure control of iron hydroxide nanoparticles using surfactants with different molecular structures. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *298*, 202-208.
80. Que, E.L.; Chang, C.J. A smart magnetic resonance contrast agent for selective copper sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15942-15943.

81. Waggoner, D.J.; Bartnikas, T.B.; Gitlin, J.D. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* **1999**, *6*, 221-230.
82. Que, E.L.; Gianolio, E.; Baker, S.L.; Wong, A.P.; Aime, S.; Chang, C.J. Copper-responsive magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8527-8536.
83. Que, E.L.; Gianolio, E.; Baker, S.L.; Aime, S.; Chang, C.J. A copper-activated magnetic resonance imaging contrast agent with improved turn-on relaxivity response and anion compatibility. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 469-476.
84. Li, W.-S.; Luo, J.; Chen, Z.-N. A gadolinium (III) complex with 8-amidequinoline based ligand as copper (II) ion responsive contrast agent. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 484-488.
85. Lipscomb, W.N.; Sträter, N. Recent advances in zinc enzymology. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2375-2434.
86. Brewer, G.J.; Kanzer, S.H.; Zimmerman, E.A.; Molho, E.S.; Celmins, D.F.; Heckman, S.M.; Dick, R. Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Am. J. Alzheimers Dis.* **2010**, *25*, 572-575.
87. Atwood, C.S.; Huang, X.; Moir, R.D.; Tanzi, R.E.; Bush, A.I. Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, *36*, 309-364.
88. Lovell, M.; Robertson, J.; Teesdale, W.; Campbell, J.; Markesbery, W. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158*, 47-52.
89. Colvin, R.A.; Fontaine, C.P.; Laskowski, M.; Thomas, D. Zn 2+ transporters and Zn 2+ homeostasis in neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *479*, 171-185.
90. Ranasinghe, P.; Pigera, S.; Galappatthy, P.; Katulanda, P.; Constantine, G.R. Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *23*, 44.
91. Kelleher, S.L.; McCormick, N.H.; Velasquez, V.; Lopez, V. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 101-111.
92. Barnham, K.J.; Bush, A.I. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 222-228.
93. Harrison, N.; Gibbons, S. Zn 2+: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* **1994**, *33*, 935-952.
94. Smart, T.G.; Xie, X.; Krishek, B.J. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog. Neurobiol.* **1994**, *42*, 393-441.
95. Choi, D.W.; Koh, J.Y. Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* **1998**, *21*, 347-375.
96. Frederickson, C.J.; Maret, W.; Cuajungco, M.P. Zinc and excitotoxic brain injury: a new model. *Neuroscientist* **2004**, *10*, 18-25.
97. Weiss, J.H.; Sensi, S.L.; Koh, J.Y. Zn 2+: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 395-401.
98. Faller, P.; Hureau, C. Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide. *Dalton Trans.* **2009**, 1080-1094.

99. Frederickson, C.J. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* **1989**, *31*, 145-238.
100. Nedumpully-Govindan, P.; Ding, F. Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration. *Sci. Rep* **2015**, *5*.
101. Song, Y.; Ho, E. Zinc and prostatic cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2009**, *12*, 640.
102. Costello, L.; Feng, P.; Milon, B.; Tan, M.; Franklin, R. Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2004**, *7*, 111.
103. Howell, G.A.; Welch, M.G.; Frederickson, C.J. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* **1984**, *308*, 736-738.
104. Takeda, A.; Tamano, H.; Enomoto, S.; Oku, N. Zinc-65 imaging of rat brain tumors. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5065-5069.
105. Maske, H. A new method for demonstrating A and B cells in the islands of Langerhans. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1955**, *33*, 1058-1058.
106. Danscher, G.; Howell, G.; Perez-Clausell, J.; Hertel, N. The dithizone, Timm's sulphide silver and the selenium methods demonstrate a chelatable pool of zinc in CNS. *Histochemistry* **1985**, *83*, 419-422.
107. Frederickson, C.J.; Howell, G.A.; Frederickson, M.H. Zinc dithizonate staining in the cat hippocampus: relationship to the mossy-fiber neuropil and postnatal development. *Exp. Neurol.* **1981**, *73*, 812-823.
108. Wang, H.; Sun, C.-L.; Yue, Y.-H.; Yin, F.-F.; Jiang, J.-Q.; Wu, H.-R.; Zhang, H.-L. New molecular probe for the selective detection of zinc ion. *Analyst* **2013**, *138*, 5576-5579.
109. Mishra, A.; Logothetis, N.K.; Parker, D. Critical in vitro evaluation of responsive MRI contrast agents for calcium and zinc. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1529-1537.
110. Matosziuk, L.M.; Leibowitz, J.H.; Heffern, M.C.; MacRenaris, K.W.; Ratner, M.A.; Meade, T.J. Structural optimization of Zn (II)-activated magnetic resonance imaging probes. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12250-12261.
111. Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Nagano, T. Selective sensing of zinc ions with a novel magnetic resonance imaging contrast agent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1840-1843.
112. Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Narazaki, M.; Yokawa, T.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Nagano, T. Design and synthesis of a novel magnetic resonance imaging contrast agent for selective sensing of zinc ion. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1027-1032.
113. Major, J.L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T.J. The synthesis and in vitro testing of a zinc-activated MRI contrast agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 13881-13886.
114. Major, J.L.; Boiteau, R.M.; Meade, T.J. Mechanisms of ZnII-activated magnetic resonance imaging agents. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 10788-10795.
115. Esqueda, A.C.; López, J.A.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzón, J.C.; Ratnakar, J.; Lubag, A.J.; Sherry, A.D.; De León-Rodríguez, L.M. A new gadolinium-based MRI zinc sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11387-11391.

116. Yu, J.; Martins, A.F.; Preihs, C.; Jordan, V.C.; Chirayil, S.; Zhao, P.; Wu, Y.; Nasr, K.; Kiefer, G.E.; Sherry, A.D. Amplifying the sensitivity of zinc (II) responsive MRI contrast agents by altering water exchange rates. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14173-14179.
117. De León-Rodríguez, L.M.; Lubag, A.J.; López, J.A.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzón, J.C.; Sherry, A.D. A second generation MRI contrast agent for imaging zinc ions in vivo. *Med. Chem. Comm.* **2012**, *3*, 480-483.
118. Luo, J.; Li, W.-S.; Xu, P.; Zhang, L.-Y.; Chen, Z.-N. Zn²⁺ responsive bimodal magnetic resonance imaging and fluorescent imaging probe based on a gadolinium (III) complex. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 9508-9516.
119. Xu, Y.Q.; Luo, J.; Chen, Z.N. Zn²⁺-Responsive Bimodal Magnetic Resonance Imaging and Fluorescence Imaging Agents and Their Interaction with Human Serum Albumin. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014*, 3208-3215.
120. Lubag, A.J.; De Leon-Rodriguez, L.M.; Burgess, S.C.; Sherry, A.D. Noninvasive MRI of β -cell function using a Zn²⁺-responsive contrast agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 18400-18405.
121. Jordan, M.V.C.; Lo, S.-T.; Chen, S.; Preihs, C.; Chirayil, S.; Zhang, S.; Kapur, P.; Li, W.-H.; De Leon-Rodriguez, L.M.; Lubag, A.J. Zinc-sensitive MRI contrast agent detects differential release of Zn (II) ions from the healthy vs. malignant mouse prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *2016*, 09450.
122. Bonnet, C.S.; Caillé, F.; Pallier, A.; Morfin, J.F.; Petoud, S.; Suzenet, F.; Tóth, É. Mechanistic Studies of Gd³⁺-Based MRI Contrast Agents for Zn²⁺ Detection: Towards Rational Design. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 10959-10969.
123. Bonnet, C.S.; Buron, F.; Caillé, F.; Shade, C.M.; Drahoš, B.; Pellegatti, L.; Zhang, J.; Villette, S.; Helm, L.; Pichon, C. Pyridine-Based Lanthanide Complexes Combining MRI and NIR Luminescence Activities. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1419-1431.
124. Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahoš, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Tóth, É. Pyridine-based lanthanide complexes: towards bimodal agents operating as near infrared luminescent and MRI reporters. *Chem. Commun.* **2008**, 6591-6593.
125. Aime, S.; Fedeli, F.; Sanino, A.; Terreno, E. A R₂/R₁ ratiometric procedure for a concentration-independent, pH-responsive, Gd (III)-based MRI agent. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11326-11327.
126. Lacerda, S.; Marques, F.; Campello, P.; Gano, L.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Santos, I. Chemical, radiochemical and biological studies of Sm and Ho complexes of H₄dota analogues containing one methylphosphonic/phosphinic acid pendant arm. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 36-43.
127. Frullano, L.; Catana, C.; Benner, T.; Sherry, A.D.; Caravan, P. Bimodal MR-PET agent for quantitative pH imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *122*, 2432-2434.
128. Gianolio, E.; Napolitano, R.; Fedeli, F.; Arena, F.; Aime, S. Poly- β -cyclodextrin based platform for pH mapping via a ratiometric ¹⁹F/¹H MRI method. *Chem. Commun.* **2009**, 6044-6046.
129. Gianolio, E.; Maciocco, L.; Imperio, D.; Giovenzana, G.B.; Simonelli, F.; Abbas, K.; Bisi, G.; Aime, S. Dual MRI-SPECT agent for pH-mapping. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1539-1541.
130. Aime, S.; Botta, M.; Bruce, J.I.; Mainero, V.; Parker, D.; Terreno, E. Modulation of the water exchange rates in [Gd-DO3A] complex by formation of ternary complexes with carboxylate ligands. *Chem. Commun.* **2001**, 115-116.

131. Botta, M.; Aime, S.; Barge, A.; Bobba, G.; Dickins, R.S.; Parker, D.; Terreno, E. Ternary complexes between cationic GdIII chelates and anionic metabolites in aqueous solution: an NMR relaxometric study. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2102-2109.
132. Raylman, R.R.; Majewski, S.; Lemieux, S.K.; Velan, S.S.; Kross, B.; Popov, V.; Smith, M.F.; Weisenberger, A.G.; Zorn, C.; Marano, G.D. Simultaneous MRI and PET imaging of a rat brain. *Phys. Med. Biol.* **2006**, *51*, 6371.
133. Donati, O.F.; Hany, T.F.; Reiner, C.S.; von Schulthess, G.K.; Marincek, B.; Seifert, B.; Weishaupt, D. Value of retrospective fusion of PET and MR images in detection of hepatic metastases: comparison with 18F-FDG PET/CT and Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 692-699.
134. Seemann, M.D. Whole-body PET/MRI: the future in oncological imaging. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2005**, *4*, 577-582.
135. Spencer, S.S. The relative contributions of MRI, SPECT, and PET imaging in epilepsy. *Epilepsia* **1994**, *35*.
136. Wang, J.T.W.; Cabana, L.; Bourgognon, M.; Kafa, H.; Protti, A.; Venner, K.; Shah, A.M.; Sosabowski, J.K.; Mather, S.J.; Roig, A. Magnetically decorated multiwalled carbon nanotubes as dual MRI and SPECT contrast agents. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 1880-1894.
137. Misri, R.; Meier, D.; Yung, A.C.; Kozlowski, P.; Häfeli, U.O. Development and evaluation of a dual-modality (MRI/SPECT) molecular imaging bioprobe. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 1007-1016.

Chapitre II

Détection du Zn(II) par des complexes de Gd(III) à base de pyridine : Optimisation de la stabilité et de la réponse au Zn(II)

Table des matières

1. Introduction.....	101
2. Synthèse des ligands L1, L2, L3A et L3B	102
2.1. Synthèse du ligand L1	102
2.1.1. Synthèse par la voie A.....	103
2.1.2. Synthèse par la voie B.....	107
2.1.3. Conclusion sur les voies de synthèse du ligand L1	109
2.2. Synthèse du ligand L2	109
2.2.1. Approche par rétrosynthèse	109
2.2.2. Synthèse par substitutions nucléophiles successives.....	110
2.3. Synthèse des ligands modèles L3A et L3B	111
3. Caractérisation des complexes de lanthanides LnL1 et LnL2	113
3.1. Propriétés thermodynamiques	113
3.1.1. Constantes de protonation	113
3.1.2. Constantes de stabilité	115
3.2. Propriétés magnétiques (Profil NMRD).....	120
4. Etude de l'influence du Zn(II) sur les propriétés relaxométriques de LnL1 et LnL2	122
4.1. Influence du Zn(II) sur la relaxivité	122
4.2. Mesures de temps de vie de luminescence	124
4.3. Influence du groupement chélatant du Zn(II) sur la relaxivité.....	125
5. Détection de Zn(II) en présence de HSA.....	126

5.1. Introduction sur la HSA	126
5.2. Relaxivité en présence de HSA.....	128
5.3. Affinité des complexes pour la HSA.....	129
5.4. Analyse des courbes NMRD	133
5.4.1. Détermination de q	133
5.4.2. Fits par l'approche Lipari-Szabo	133
5.5. Sélectivité par rapport aux cations biologiques.....	135
 6. Conclusions et perspectives	 137
 7. Bibliographie.....	 138

1. Introduction

La conception d'agents de contraste responsifs au Zn(II) est importante pour mieux comprendre le rôle de ce cation métallique dans les processus biologiques et dans les différentes pathologies où il est impliqué. Dans ce cadre, le choix de la partie complexante du gadolinium(III) et celle spécifique au Zn(II) est une étape décisive.

Il a été rappelé précédemment dans le chapitre 1 que le complexe Gd(III)-pyridine poly(aminocarboxylate) **GdPy** est stable thermodynamiquement et inerte cinétiquement. Ce complexe, avec deux molécules d'eau en première sphère de coordination, présente également de bonnes propriétés de relaxation et ne forme pas de complexes ternaires avec les anions endogènes [1].

Nous avons également vu que le motif di-(picolyl)amine (DPA) a été souvent utilisé pour la complexation de Zn(II) puisqu'il possède une bonne affinité et une bonne sélectivité pour le Zn(II) [2]. Ainsi, les travaux réalisés précédemment dans notre équipe ont décrit une famille d'agents de contraste responsifs au Zn(II), constitués d'une unité pyridinique comme partie chélatante du Gd(III) à laquelle un motif DPA modifié a été ajouté via un espaceur. Cela a conduit aux agents responsifs **Gd25**, **Gd26** et **Gd27** présentés précédemment (**Figure I. 22**). Des études potentiométriques ont montré que la présence de la fonction amide sur **Gd26** était nécessaire pour assurer la stabilité thermodynamique du complexe de Gd(III) en présence de Zn(II).

Dans le souci d'améliorer les propriétés thermodynamiques et la réponse au Zn(II), nous avons envisagé de synthétiser les ligands **L1** et **L2** présentés ci-dessous (**Figure II. 1**). Le ligand **L1** possède la même partie complexante de Gd(III) et le même linker que le ligand du système **Gd26** (en vert sur la **Figure II. 1**). Les modifications ont été apportées sur la partie ciblant de Zn(II). En effet, pour le ligand de **Gd26**, une pyridine du DPA avait été remplacée par une fonction carboxylate. Pour **L1**, nous avons choisi de conserver le motif DPA, en introduisant des groupements carboxylates en position *méta* sur la pyridine. Ces carboxylates pourraient potentiellement coordonner le Gd(III) en absence de Zn(II) et se décoordiner en sa présence. Ainsi, une détection de Zn(II) par variation du nombre d'hydratation de Gd(III) serait possible.

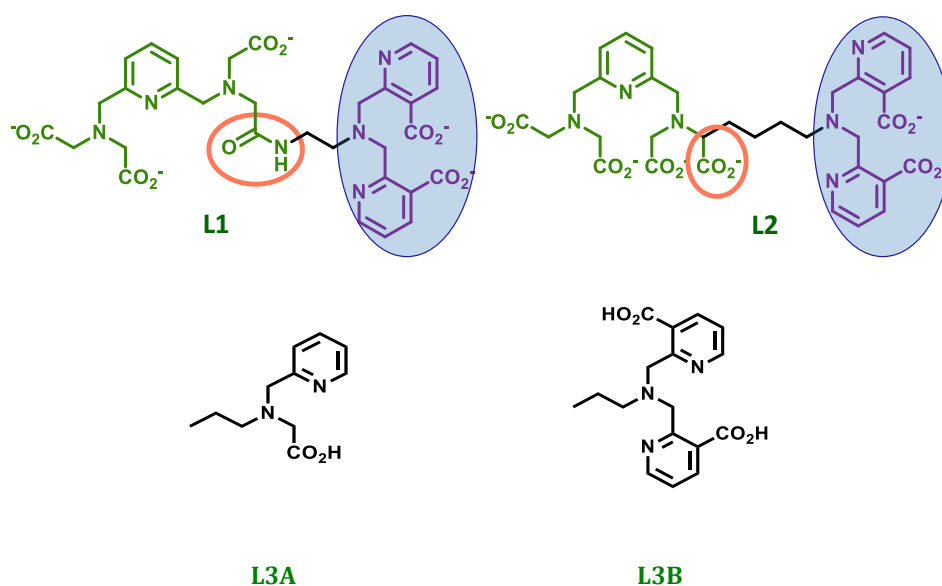


Figure II. 1 : Structure des ligands **L1**, **L2** et des molécules modèles **L3A** et **L3B**.

Le ligand **L2** comporte la même partie ciblant pour le Zn(II) que **L1**. Cependant, une modification de la partie chélatante de Gd(III) a été apportée. En effet, une fonction carboxylate a été introduite à la place d'une fonction amide pour augmenter la stabilité du complexe de Gd(III) en présence de Zn(II) .

Les molécules modèles **L3A** et **L3B** (**Figure II. 1**) miment les parties ciblantes de Zn(II) pour **Gd26**, **Gd27** d'une part, et **L1**, **L2** d'autre part. Elles nous permettront d'étudier les propriétés physico-chimiques des unités DPA modifiées pour mieux rationaliser les réponses au Zn(II) .

2. Synthèse des ligands **L1**, **L2**, **L3A** et **L3B**

2.1. Synthèse du ligand **L1**

Les deux voies qui ont été exploitées pour la synthèse du ligand **L1** sont présentées en rétrosynthèse sur le schéma **II. 1**. La voie A passe par l'intermédiaire **6** qui comporte l'entité ciblant de Zn(II) liée à l'espacer avant d'être couplée à l'unité complexante de Gd(III) **2**. L'intérêt de cette voie est de garder le composé **6** pour ensuite varier la partie chélatante de Gd(III) et ainsi créer une plateforme d'agents responsifs au Zn(II) . La voie B permet de synthétiser l'intermédiaire **10**, qui est constitué de la partie chélatante de

Gd(III) et de l'espaceur, puis d'y ajouter la partie spécifique de la complexation de Zn(II). L'intérêt de cette deuxième approche est qu'en modifiant une seule étape de la synthèse, il est possible de modifier l'entité ciblante pour un motif plus sélectif ou pour un cation métallique différent tout en conservant l'espaceur.

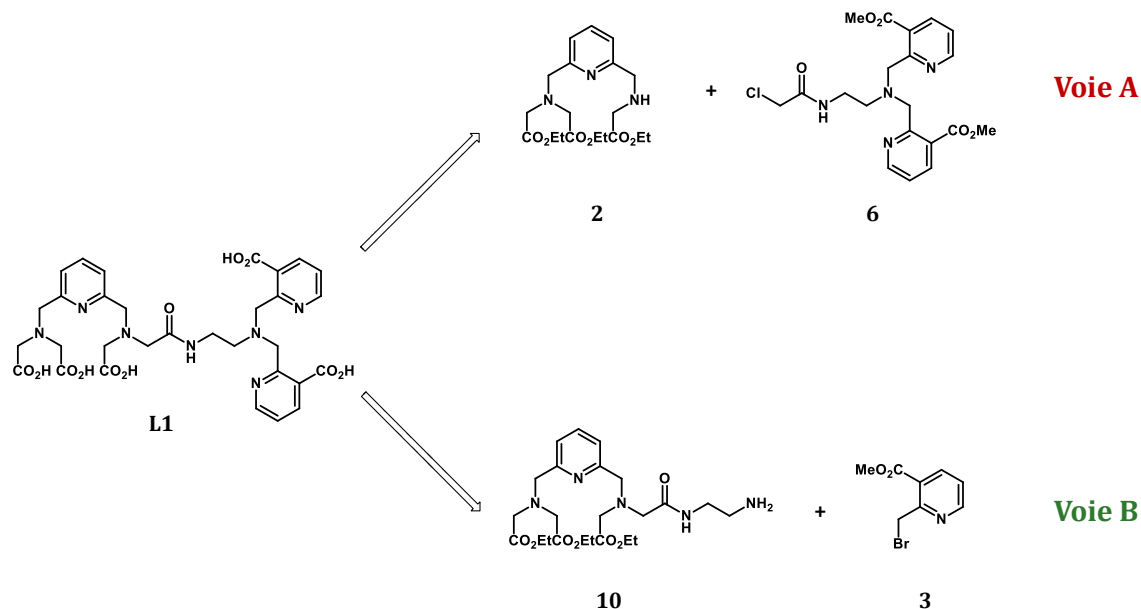


Schéma II. 1 : Voies de rétrosynthèse du composé L1

2.1.1. Synthèse par la voie A

Comme l'illustre le schéma II. 2, la première étape de cette synthèse consiste à obtenir la partie chélatante de Gd(III). Ainsi, l'intermédiaire **1** est obtenu avec un rendement de 87% après une monosubstitution nucléophile statistique du 2,6-bis(bromométhyl)pyridine avec le diéthyliminodiacétate en présence de carbonate de potassium. Afin d'éviter la réaction parasite de disubstitution, la réaction est conduite en milieu dilué avec un excès de 2,6-bis(bromométhyl)pyridine et l'amine est ajoutée goutte à goutte pour éviter la réaction de di-substitution.

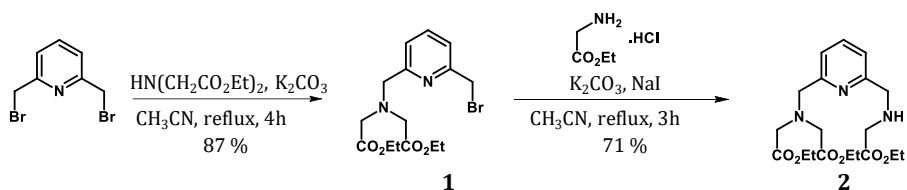


Schéma II. 2 : Synthèse du composé 2

L'amine secondaire **2** est ensuite synthétisée, en suivant la même méthode que précédemment, avec un rendement de 71 % à partir du dérivé bromé **1** en présence du chlorhydrate d'ester éthylique de glycine en excès. On ajoute ici l'iodure de sodium pour substituer *in situ* l'halogène et obtenir ainsi l'iodure qui est un meilleur groupe partant.

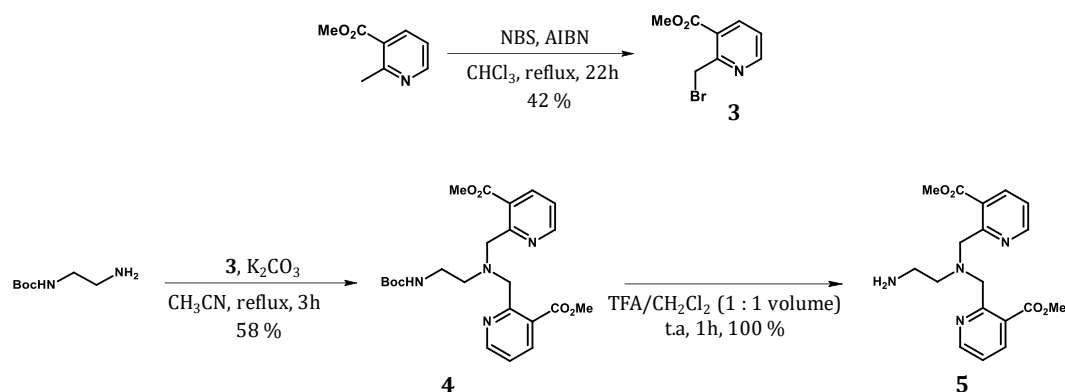


Schéma II. 3 : Synthèse des composés **3** et **5**.

La partie chélatante de Zn(II) peut ensuite être formée. Pour cela, le composé **3** (**Schéma II. 3**) est obtenu avec un rendement de 42 %, après une bromation radicalaire sur le méthyl 2-méthylnicotinate commercial en présence de NBS et d'AIBN qui sert d'initiateur radicalaire. Ce rendement est conforme à la littérature pour ce type de réaction [3–5].

L'intermédiaire **3** est engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec de la N-Boc-éthylène diamine en présence de carbonate de potassium. Cette étape permet d'introduire le linker entre la partie complexante de Gd(III) et celle chélatante de Zn(II). Cela a conduit à la formation du composé **4** avec un rendement de 58 % (**Schéma II. 3**).

La molécule **4** est ensuite déprotégée quantitativement en milieu acide pour donner l'intermédiaire **5** (**Schéma II. 3**). L'amine **5** ainsi obtenue, subit une acylation par du chlorure de chloroacétyle en présence d'une base pour former l'amide correspondant **6** avec un rendement de 80 % (**Schéma II. 4**).

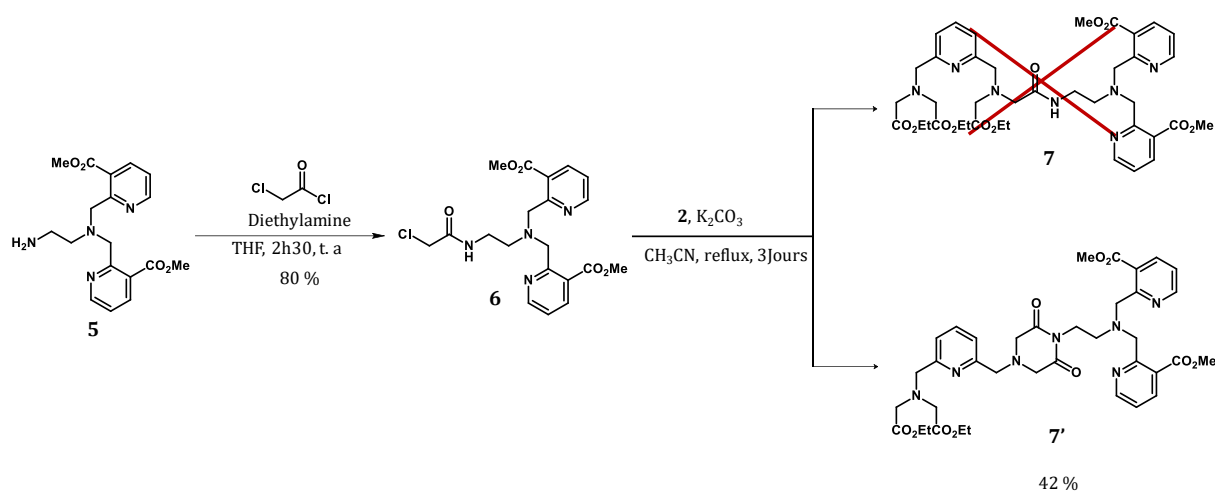


Schéma II. 4 : Synthèse du précurseur 7'

La réaction de l'intermédiaire **6** avec le composé **2** en présence du carbonate de potassium devrait conduire à la formation du composé **7** mais l'imide cyclique **7'** est obtenu. En effet, l'analyse en spectrométrie de masse haute résolution montre un pic de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ m/z à 748,33 pour la molécule **7'** au lieu de 794,36 pour la molécule **7**, ce qui peut correspondre à la perte d'un groupe HOEt (**Annexe 1**). Une étude complète en spectroscopie de RMN 1D et 2D (**Figure II. 2**) a permis d'attribuer le signal correspondant aux protons H12 qui sont représentés par un singulet intégrant pour 4 protons. En HMBC, on a observé un couplage entre ces protons H12 et les carbonyles de l'imide.

Cette molécule est obtenue avec un rendement plutôt faible de 42 %. En effet, nous avons observé l'hydrolyse partielle du réactif **6** (en défaut) aboutissant à une fonction alcool. Cette fonction devient alors un compétiteur de la fonction amine du composé **2**, entraînant ainsi une diminution du rendement. On peut noter que nos composés possèdent un caractère hygroscopique et qu'il est difficile d'obtenir des conditions anhydres strictes.

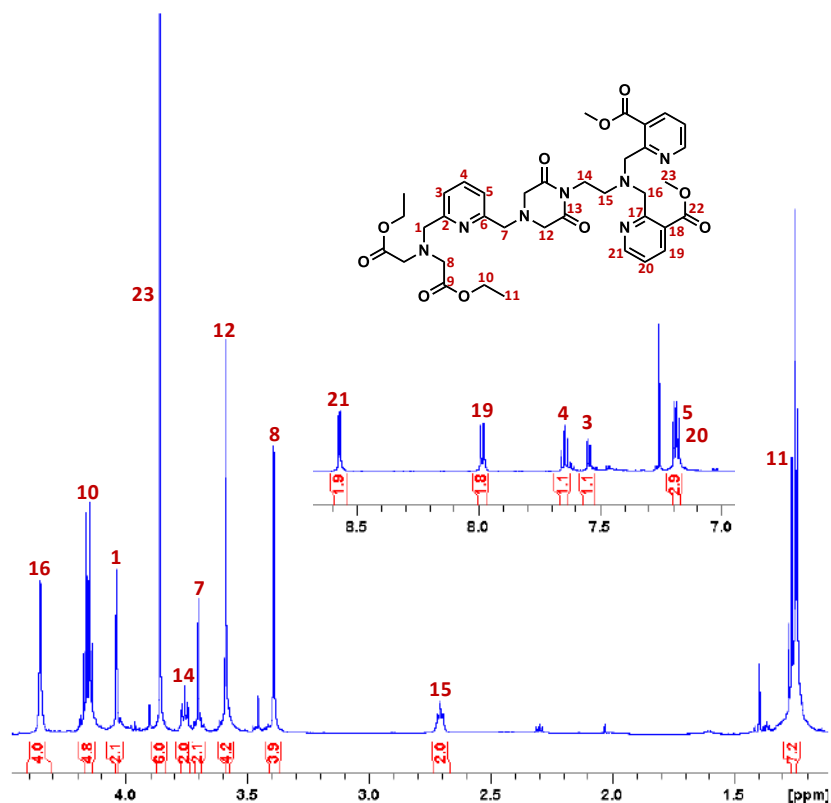


Figure II. 2 : Spectre de ^1H du composé **7'** dans du CDCl_3 à 600 MHz.

L'ouverture du cycle a été réalisée par hydrolyse basique en présence d'hydroxyde de lithium. Cette réaction conduit ainsi à la formation du produit **L1** avec un rendement quantitatif.

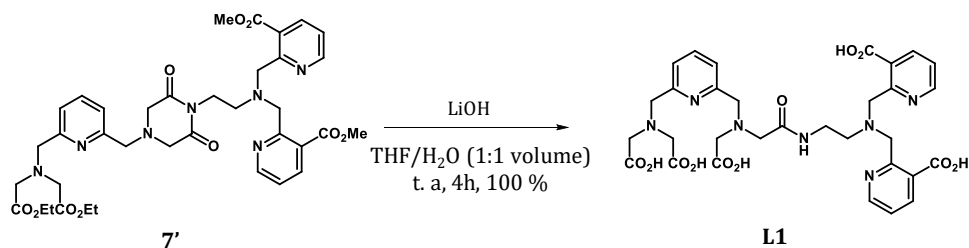


Schéma II. 5 : Synthèse du ligand **L1** par la voie A

L'étude complète en spectroscopie de RMN 1D et 2D a confirmé l'ouverture du cycle de l'imide cyclique **7'** (**Figure II. 3** et **Annexe 2 - 4**). En effet, sur le spectre ^1H RMN de la **figure II. 3** on obtient les signaux des protons H10 et H12 qui ne sont plus identiques. De plus en HMBC, on peut observer un couplage d'un des 2 protons avec le carbonyle de

l'amide alors que les autres 2 couplent avec le carbonyle d'une fonction acide carboxylique.

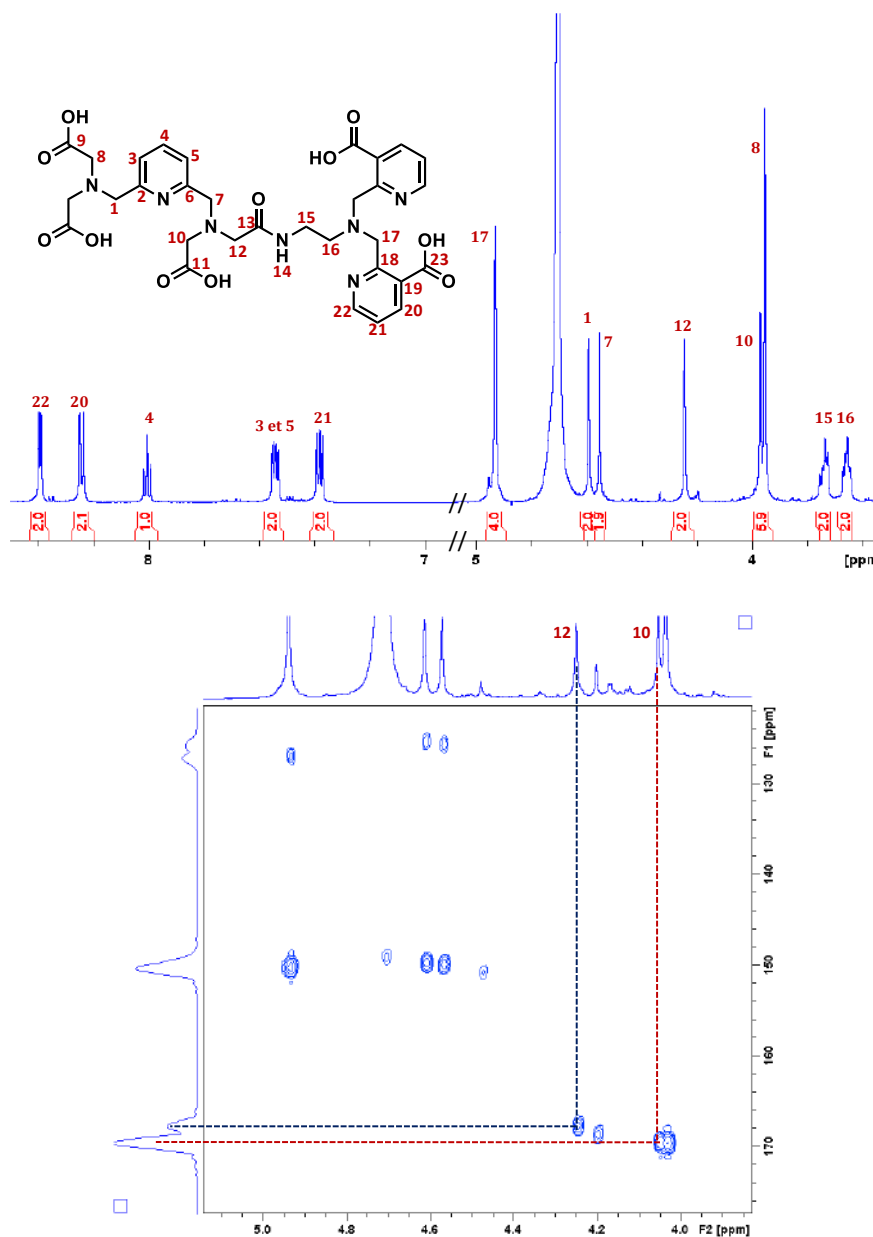


Figure II. 3 : Spectre ^1H et HMBC RMN du ligand dans D_2O .

2.1.2. Synthèse par la voie B

La voie B commence par la synthèse du linker. Ainsi, l'intermédiaire **8** est obtenu avec un rendement de 80% après une réaction d'acylation de N-Boc-éthylène diamine par le chlorure de chloroacétyle en présence du carbonate de potassium (**Schéma II. 6**).

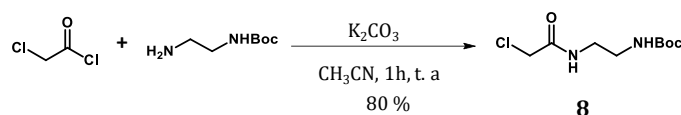


Schéma II. 6 : Synthèse de l'intermédiaire **8**

Comme dans la voie A, la réaction entre les molécules **2** et **8** (ratio 1 :4) en présence de carbonate de potassium et d'iodure de sodium conduit à la formation de l'imide cyclique **9'** avec un rendement de 87%. L'obtention de cet intermédiaire cyclique a été confirmée de la même manière que **7'**. Le rendement obtenu est effectivement bien supérieur à celui du composé **7'**. Les conditions utilisées dans ce cas permettent donc de limiter la réaction secondaire d'hydrolyse, notamment en utilisant un excès de composé halogéné en présence de l'iodure de sodium, qui permet de produire *in situ* un intermédiaire plus réactif.

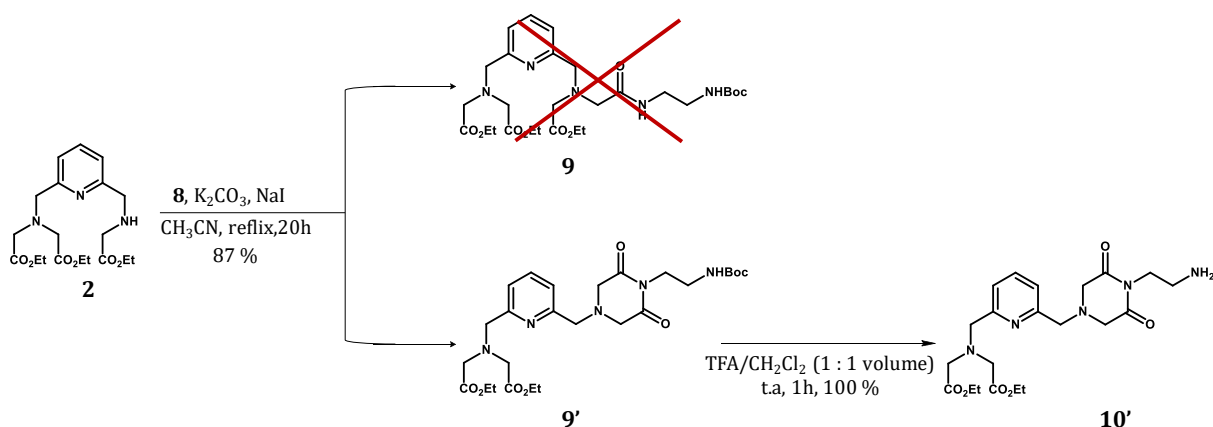


Schéma II. 7 : Synthèse de l'intermédiaire **10'**

La déprotection quantitative de la fonction amine en milieu acide conduit à la formation de la molécule **10'**.

Pour obtenir le ligand protégé, l'amine primaire **10'** est engagée dans une réaction de substitution nucléophile avec deux équivalents de l'intermédiaire bromé **3** en présence de carbonate de potassium (**Schéma II. 8**). Le produit disubstitué **7'** est obtenu avec un rendement de 38%.

Les fonctions ester de la molécule **7'** sont hydrolysées en milieu basique pour aboutir au ligand **L1** avec un rendement de 100%.

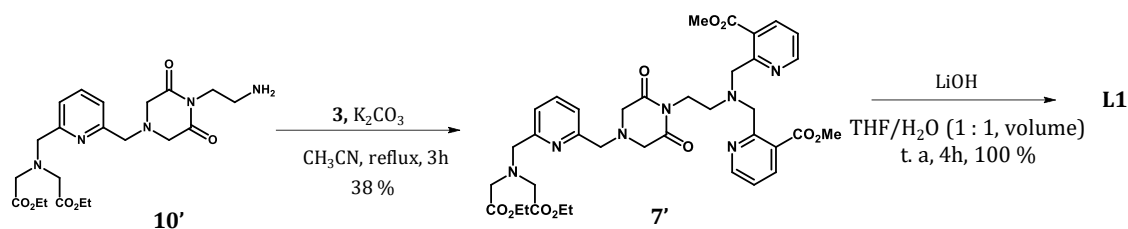


Schéma II. 8 : Synthèse du ligand **L1** par la voie B

2.1.3. Conclusion sur les voies de synthèse du ligand **L1**

Dans la voie A, le ligand **L1** est obtenu après 8 étapes de synthèse et un rendement global de 5 % est obtenu. Par la voie B, après 8 étapes de synthèse, le ligand **L1** est obtenu avec un rendement global de 7 %. Ces deux voies conduisent à la formation du ligand **L1** avec des rendements de même ordre de grandeur. Ces rendements modérés nous ont tout de même permis d'obtenir les composés finaux dans des quantités suffisantes pour faire nos analyses, mais les rendements de synthèse pourraient être optimisés. En effet, nous avons vu que pour limiter l'influence de la réaction parasite d'hydrolyse de l'halogène, il est préférable d'utiliser un excès de composé halogéné en présence éventuelle de NaI, notamment pour les composés chlorés.

L'intérêt d'avoir exploité ces deux voies est que cela permettra de choisir l'une ou l'autre en fonction des besoins. D'une part, en changeant l'unité complexante de Gd(III) on créera une plateforme d'agents responsifs au Zn(II) avec différentes sphères de coordination du Gd(III). D'autre part, en modifiant l'unité ciblante de Zn(II), on créera des agents responsifs plus sélectifs ou on ciblera différents cations métalliques.

2.2. Synthèse du ligand **L2**

2.2.1. Approche par rétrosynthèse

Le schéma **II. 9** représente l'approche retro synthétique pour l'obtention du ligand **L2**. Celui-ci diffère du ligand **L1** par la présence d'une fonction carboxylate à la place de l'amide. Cette fonction est introduite dans le ligand en utilisant un linker dérivé de la lysine. Puis, le processus de synthèse est identique à celui de la voie B du **L1**.

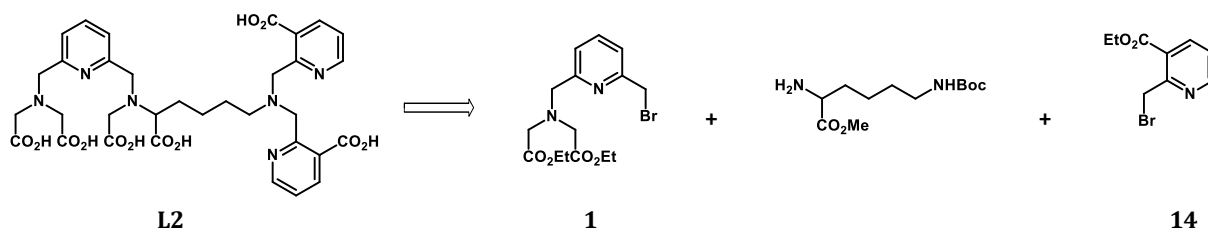


Schéma II. 9 : Rétrosynthèse du ligand L2

2.2.2. Synthèse par substitutions nucléophiles successives

L'amine **11** est obtenue avec un rendement de 71 % après une réaction de substitution nucléophile de la lysine commerciale sur le composé mono bromé **1** en présence de la diisopropylethylamine (DIEA, **Schéma II. 10**). Un excès de la lysine commerciale est utilisé dans un milieu dilué afin de limiter la formation d'un composé disubstitué.

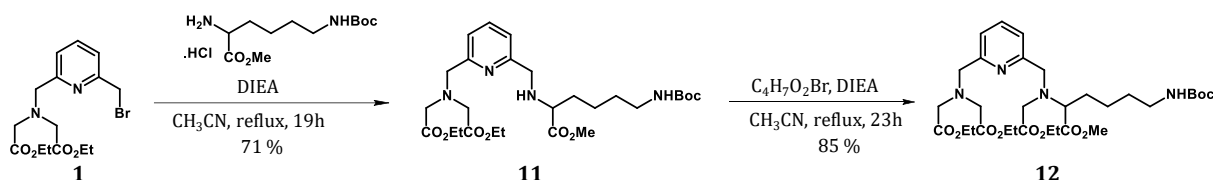


Schéma II. 10 : Synthèse de l'intermédiaire 12

L'intermédiaire **11** réagit avec le bromoacétate d'éthyle en présence de la DIEA pour former le composé protégé **12** avec un rendement de 85 % (**Schéma II. 11**). Le groupement protecteur carbamate est ensuite clivé en milieu acide pour donner l'amine **13** avec un rendement quantitatif.

Le précurseur **15** est obtenu avec un rendement de 85 % après l'alkylation de l'intermédiaire aminé **13** sur la molécule bromée **14** en présence de la DIEA et NaI. De la même manière que le composé **3**, le composé bromé **14** a été obtenu avec un rendement similaire.

Après hydrolyse des esters du composé **15** en milieu basique, le ligand **L2** a été obtenu avec un rendement de 90 %. Ainsi, le ligand **L2** a été obtenu avec un rendement global de 15 % après 8 étapes de réactions de substitutions nucléophiles. Ce rendement est satisfaisant puisque cela correspond à un rendement moyen de 79 % pour chaque étape.

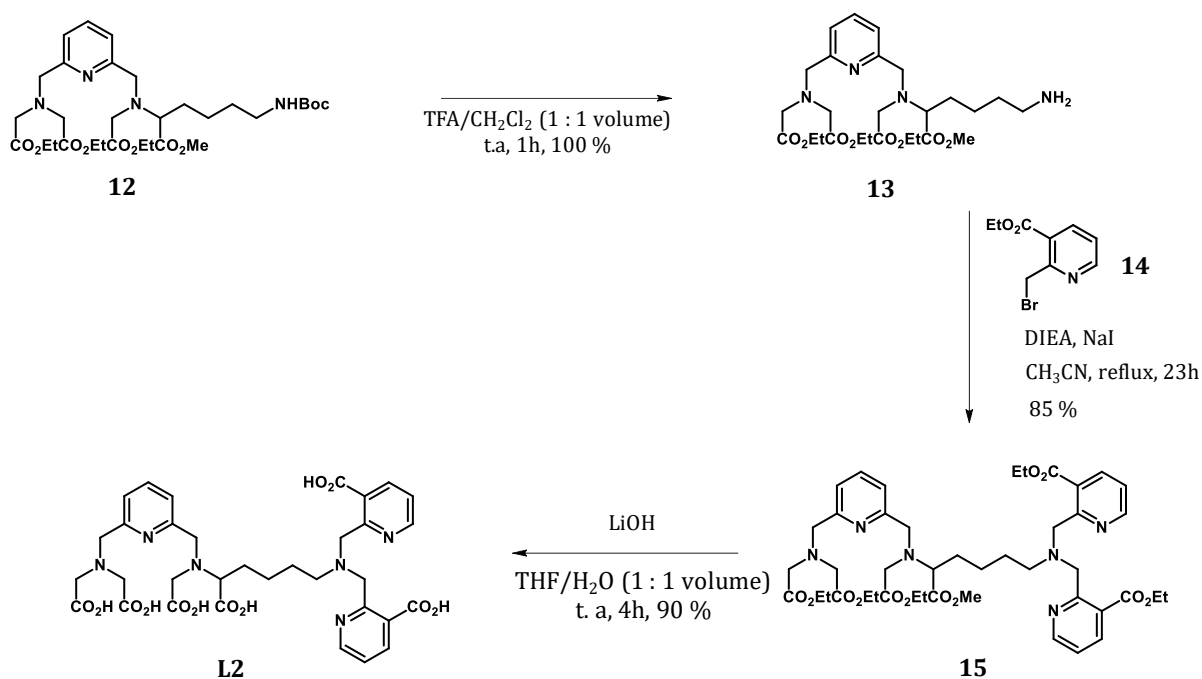


Schéma II. 11 : Synthèse du ligand L2

Lors de la synthèse du ligand **L2**, les rendements des réactions similaires au **L1** ont été améliorés. Ainsi, une augmentation du nombre d'équivalent du composé halogéné a permis d'atténuer une éventuelle réaction secondaire d'hydrolyse de l'halogène, et ainsi d'améliorer le rendement d'une réaction de dialkylation (38 % pour **L1** et 85% pour **L2**). En plus, une formation de cycle n'a pas été observée pour le ligand **L2**. En effet, dans le cas du **L2**, on aurait obtenu un cycle à 7 atomes moins stable que celui à 6 obtenu pour le ligand **L1**.

2.3. Synthèse des ligands modèles L3A et L3B

Les ligands **L3A** et **L3B** miment les parties complexantes de Zn(II) pour les ligands précédemment développés et pour **L1**, **L2**. Ils ont été synthétisés par des voies de synthèses similaires à partir de la propylamine (**Schéma II. 12**).

La réaction d'alkylation de la propylamine par le bromoacétate d'éthyle a conduit à la formation de l'amine secondaire **16** avec un rendement de 77%. Cet intermédiaire réagit ensuite par substitution nucléophile avec la 2-(chlorométhyl)pyridine en présence de carbonate de potassium pour donner le précurseur **17** avec un rendement de 59%.

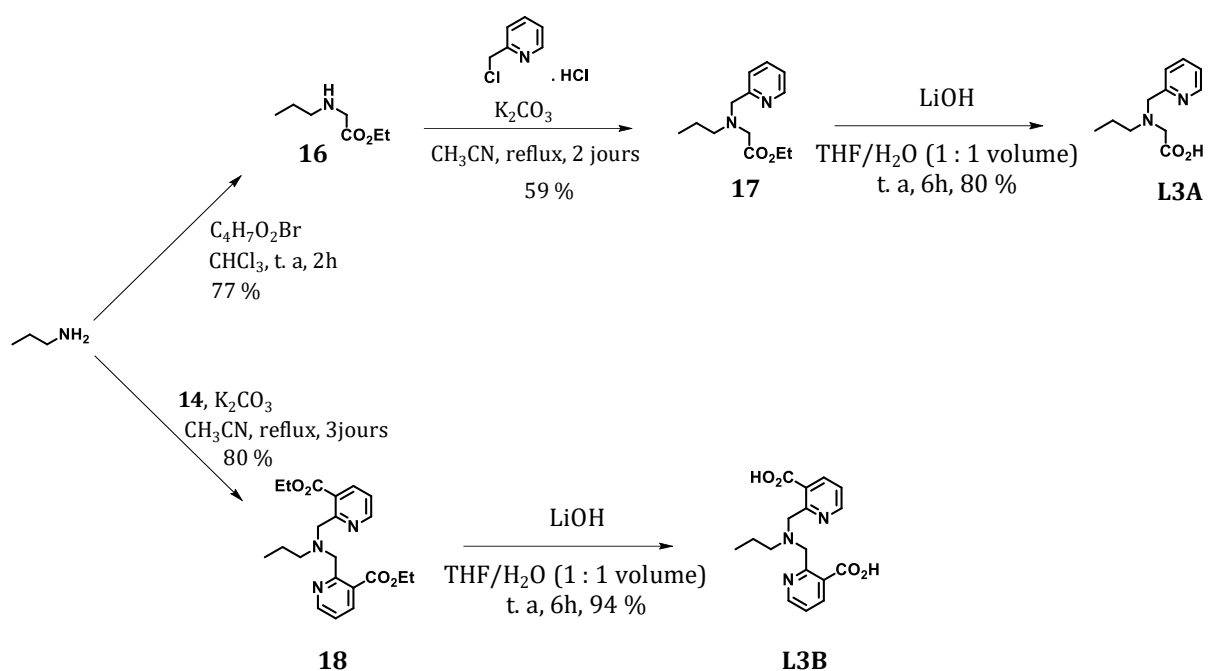


Schéma II. 12 : Synthèse du ligand L3A et L3B

Le ligand **L3A** est obtenu avec un rendement de 80 % après hydrolyse de l'ester en milieu basique (**Schéma II. 12**).

Une double alkylation de la propylamine et l'intermédiaire **14** en présence de carbonate de potassium a conduit à l'obtention du précurseur **18** avec un rendement de 80%. Après hydrolyse des esters en milieu basique, le ligand **L3B** a été obtenu avec un rendement de 94 %.

Nous nous sommes par la suite intéressés à la caractérisation complète des ligands **L1** et **L2**, ainsi que de leurs complexes de Ln(III). Nous avons également étudié l'influence du Zn(II) sur les propriétés de relaxation de **GdL1** et **GdL2**, en absence et en présence de HSA (Human Serum Albumin).

3. Caractérisation des complexes de lanthanides LnL1 et LnL2

3.1. Propriétés thermodynamiques

La stabilité thermodynamique d'un agent de contraste est primordiale pour son utilisation dans des applications *in vivo*. C'est dans ce cadre que nous avons étudié par potentiométrie la stabilité des complexes **GdL1** et **GdL2**. La sélectivité pour Gd(III) par rapport aux cations endogènes a également été étudiée. Les courbes du dosage sont représentées dans les figures II. 4 ci-dessous.

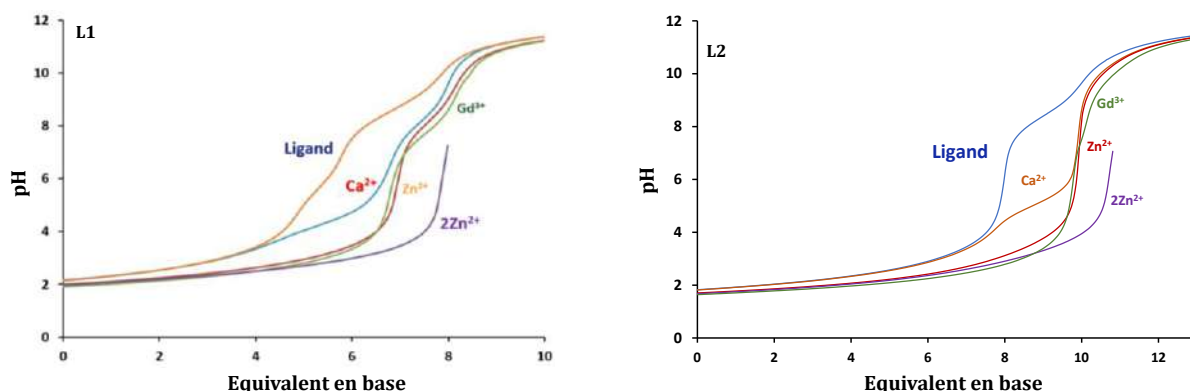


Figure II. 4 : Titrages potentiométriques des solutions de **L1** ou **L2** seul, ou avec 1 équivalent de GdCl_3 , 1 de CaCl_2 et 1 ou 2 équivalents de ZnCl_2 dans le KCl 0,1 M à 298 K.

3.1.1. Constantes de protonation

Les constantes de protonation associées aux ligands ont une influence sur les constantes de stabilité de leurs complexes. Nous avons donc déterminé dans un premier temps ces constantes par potentiométrie et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.1 ci-dessous.

Il est important d'attribuer les constantes de protonation pour les systèmes modèles **L3A** et **L3B** afin d'étudier sans ambiguïté celles des systèmes **L1** et **L2**. Pour **L3A** et **L3B**, la première constante de protonation correspond à celle de l'amine tertiaire. Puis pour **L3A**, la constante de protonation de 1.89(3) pourrait correspondre à la protonation de l'azote de la pyridine [6] et celle à 2.16(4), à la protonation du carboxylate. Pour **L3B**, les protonations des azotes de la pyridine sont sans doute trop basses pour être observées, et les deux dernières constantes obtenues sont celles des carboxylates des pyridines.

Tableau II.1 : Constantes de protonation des ligands **L1**, **L2**, **L3A** et **L3B** déterminées par potentiométrie dans KCl 0.1 M à 298 K. Les constantes des ligands **Py** et **26** sont aussi présentées pour comparaison.

Log K _H	L1	L2	L3A	L3B	Py[1]	26[7]
Log K _{H1}	8.98(2)	10.53(9)	8.54(3)	9.53(4)	8,95	8.80
Log K _{H2}	8.22(5)	8.75(6)	2.16(4)	3.51(5)	7,85	7.93
Log K _{H3}	5.73(8)	8.04(4)	1.89(3)	2.34(4)	3,38	6.27
Log K _{H4}	3.53(9)	3.79(5)	-	-	2,48	3.50
Log K _{H5}	2.64(3)	2.81(6)	-	-	-	2.4
Log K _{H6}	2.14(3)	2.40(9)	-	-	-	-
Log K _{H7}	-	1.9 (1)	-	-	-	-

Les ligands **L1** et **L2** comptent respectivement 6 et 7 constantes de protonation, ce qui reflète l'introduction d'une fonction carboxylate protonable supplémentaire pour **L2**. Les trois premières constantes correspondent aux protonations des amines, alors que les autres correspondent à la protonation de fonctions carboxylates. Par comparaison avec les constantes de protonation de **L3A** et **L3B**, on peut attribuer la constante de protonation la plus élevée à la fonction amine tertiaire se trouvant du côté de la DPA modifiée. Cette constante est plus élevée pour **L2** que pour **L1** ou **L3B**, ce qui peut s'expliquer par la présence d'une chaîne alkyle de type pentyl, plus longue que pour les autres composés, exerçant un effet inductif donneur plus important, et par conséquent augmentant la basicité de l'azote.

Les deux autres constantes (logK_{H2} et H₃) correspondent aux protonations des atomes d'azote de la partie complexante de Gd(III) (fonction amine tertiaire). Pour le ligand **L1**, la constante de protonation à 5,73(8) peut être attribuée à l'atome d'azote portant la fonction amide.

D'autre part, les constantes de protonation des azotes des pyridines sont trop basses pour être observées, comme déjà vu précédemment [1].

3.1.2. Constantes de stabilité

Ces ligands contiennent deux sites de complexation chacun, des espèces bimétalliques peuvent donc être potentiellement observées. Afin de vérifier la stœchiométrie des complexes de Ln(III), nous avons réalisé des mesures de l'intensité de luminescence du complexe d'Eu(III) avec **L2**, en fonction de nombre d'équivalents en Eu(III). En effet, il est possible d'exciter la pyridine et d'observer le transfert d'énergie et donc l'émission de luminescence de l'Eu(III) dans ces complexes. Les résultats obtenus pour le ligand **L2** sont présentés **figure II. 5**.

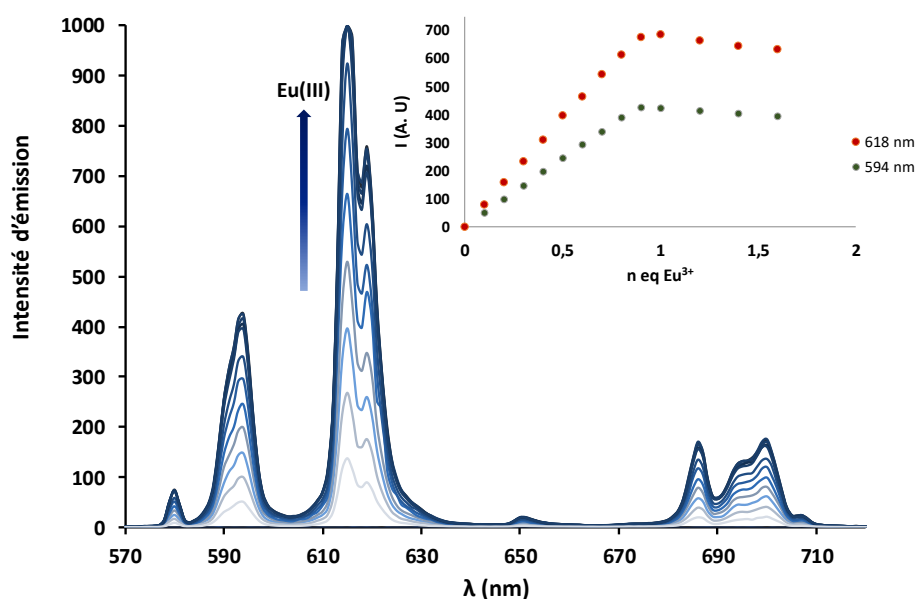


Figure II. 5 : Spectres d'émission de **EuL2** ($\lambda_{\text{ex}} = 268$ nm, $[\text{L2}] = 200$ μM) en fonction de la concentration en Eu(III) dans l'HEPES 0,1 M (pH=7,4) à 298 K ; Intensité de luminescence des transitions $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ ($\lambda_{\text{em}} = 594$ nm) et $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ ($\lambda_{\text{em}} = 618$ nm) du complexe **EuL2** dans les mêmes conditions.

Un spectre typique d'émission de l'euporium est obtenu. L'intensité des bandes d'émission $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ et $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ augmente linéairement avec la quantité d'Eu(III) ajoutée jusqu'à atteindre un plateau à 1 équivalent. Au-delà de cette concentration, l'intensité de luminescence reste constante, signifiant que l'euporium n'est plus complexé par le ligand. Par conséquent, seule la formation du complexe de lanthanide dans un rapport 1 : 1 (cation métallique : Ligand) est observée.

Les constantes de stabilité, ainsi que les constantes de protonation des ligands **L1** et **L2** avec Gd(III), Ca(II) et Zn(II) ont été mesurés dans un rapport M : L = 1 : 1 par potentiométrie. Des mesures dans un rapport M : L = 2 : 1 ont également été réalisées avec les cations endogènes notamment le Ca(II) et le Zn(II) (**Tableau II. 2**). Toutes ces mesures ont été effectuées dans KCl 0,1 M à 298 K.

Tableau II. 2 : Constantes de stabilité des ligands avec Gd(III) et cations endogènes mesurées par potentiométrie dans KCl 0,1 M à 298 K.

Log K	L1	L2	26 [7]	Py [1]	L3A	L3B
Log K_{GdL}	16.27(8)	20.1(1)	15.15	18.60	–	–
Log K_{GdLH}	7.24(7)	8.92(6)	7.69	-	–	–
Log K_{GdLH2}	3.26(5)	3.74(4)	3.51	-	–	–
Log K_{GdLH3}	2.56(4)	2.54(6)	-	-	–	–
Log K_{CaL}	8.90(6)	10.22(5)	8.05	9.43	1.57(7)	Trop faible
Log K_{CaLH}	7.89(3)	9.86(7)	8.10	-	-	-
Log K_{CaLH2}	4.55(4)	5.1(1)	-	-	-	-
Log K_{ZnL}	13.58(9)	16.5(1)	12.7	15.84	7.68(2)	9.08(3)
Log K_{ZnLH}	7.89(3)	10.03(5)	8.15	3.81	2.53(9)	3.73(3)
Log K_{ZnLH2}	3.72(2)	4.10(4)	3.90	-	-	-
Log K_{ZnLH3}	2.71(2)	3.20(7)	-	-	-	-
Log K_{ZnLH4}	2.27(5)	2.64(1)	-	-	-	-
Log K_{Zn2L}	8.3(1)	9.9(1)	8.1	-	-	-
Log K_{Zn2LH}	3.2(1)	3.98(7)	-	-	-	-
pGd^a	14.83	17.34	13.24	17.34	-	-

a. pGd = -log [Gd(III)] libre a été calculé dans les conditions standards décrites par K. Raymond (pH = 7,4 ; [Gd(III)] = 1 µM ; [L1 ou L2] = 10 µM) [8].

Des complexes mononucléaires de Gd(III) sont formés avec **L1** et **L2**, et 3 protonations de ces complexes sont observées. Les constantes de stabilités mesurées pour Gd(III) par

potentiométrie sont de 16.27(8) pour **GdL1** et 20.1(1) pour **GdL2**. Elles indiquent la formation de complexes **GdL1** et **GdL2** stables. Les valeurs obtenues, qui sont similaires à ceux de **Gd26** et **GdPy** indiquent que la complexation a bien lieu dans la partie « pyridine » dédiée des ligands. L'introduction d'une fonction carboxylate supplémentaire sur **L2** a permis d'augmenter d'environ 4 ordres de grandeur la constante de stabilité pour Gd(III) par rapport à **L1**. Ceci se traduit par un pGd de 17.34, identique à celui de **GdPy**, comme attendu. L'apport de la fonction carboxylate supplémentaire est donc très significatif quant à la stabilité des complexes de Gd(III) correspondants.

Les 3 constantes de protonation observées correspondent aux protonations de la partie DPA modifiée, confirmant encore la complexation de Gd(III) sur la partie « pyridine » du ligand.

En ce qui concerne le zinc, les deux ligands **L1** et **L2** ont montré une formation de complexes mono et binucléaires attendus étant donné que les ligands possèdent deux sites de complexation pour ce cation. La formation de complexes protonés est également observée. La première constante de stabilité est proche de celle de **ZnPy**, et la deuxième est proche de celle observée pour **ZnL3B**. Ceci confirme bien que le premier équivalent de zinc se place dans la partie « pyridine » des ligands **L1** et **L2**. Comme pour Gd(III), la constante de complexation du complexe mononucléaire **ZnL2** est supérieure de 3 ordres de grandeur à celle de **ZnL1** du fait de la présence d'une fonction carboxylate supplémentaire. On observe également 4 constantes de protonation de ce complexe mononucléaire qui correspondent aux protonations de la partie DPA modifiée pour 3 d'entre elles et également à une protonation de la partie « pyridine » comme cela avait été observé pour **ZnPy**.

Pour les complexes dinucléaires, les constantes de stabilité sont similaires à **ZnL3B** et également à **ZnDPA** (7,57) [2]. La constante de stabilité avec **L2** est supérieure à celle avec **L1** du fait sans doute de la plus grande basicité de l'azote de l'amine tertiaire. Une protonation est également observée, correspondant à la protonation de la partie « pyridine ». Enfin, notons que la constante de complexation de **ZnL3A** est similaire à celle de **ZnAMPA** ($\log K_{\text{ZnAMPA}} = 7,57$) (**Schéma II. 13**) [9].

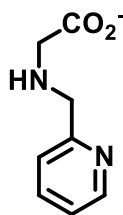


Schéma II. 13 : Structure de l'AMPA

Le calcium quant à lui forme uniquement un complexe mononucléaire avec **L1** et **L2**. Les constantes de stabilité de **CaL1** et **CaL2** sont respectivement similaires à celles obtenues pour **Ca26** et **CaPy**. La stabilité du complexe **CaL3B** étant trop faible pour être déterminée, ceci confirme que la complexation du Ca(II) a lieu dans la partie « pyridine ». Enfin, on observe deux constantes de protonation de ces complexes qui correspondent sans doute à des protonations à la fois sur la partie DPA modifiée et sur la partie « pyridine ».

Le dernier cation métallique endogène étudié est le Cu(II). Ces constantes peuvent être délicates à déterminer et il a été montré que des études spectrophotométriques sont souvent indispensables, en complément de la potentiométrie, pour déterminer ces valeurs [10]. En particulier une constante de complexation de 17.63 a été déterminée pour **CuPy** par cette méthode. Nous avons donc commencé par la détermination de la constante de stabilité de **CuL3B**. Les spectres UV-visible de **CuL3B** (**Figure II. 6**) montrent que même en présence de 2 M HCl, le complexe est déjà formé, ce qui empêche toute détermination précise de la constante de complexation de **CuL3B**, nous pouvons simplement dire que le complexe est très stable, avec une stabilité supérieure à celle de **CuPy**.

Pour les complexes **CuL1** et **CuL2**, les spectres UV-visible montrent qu'en présence d'un ou deux équivalents de Cu(II) les complexes sont déjà formés à 1 M d'HCl. Cela signifie que les complexes formés vont également être très stables mais les constantes ne peuvent être déterminées avec suffisamment de précision. Nous pouvons simplement conclure que le premier équivalent de Cu(II) devrait se mettre dans la partie DPA modifiée et le deuxième dans la partie « pyridine ».

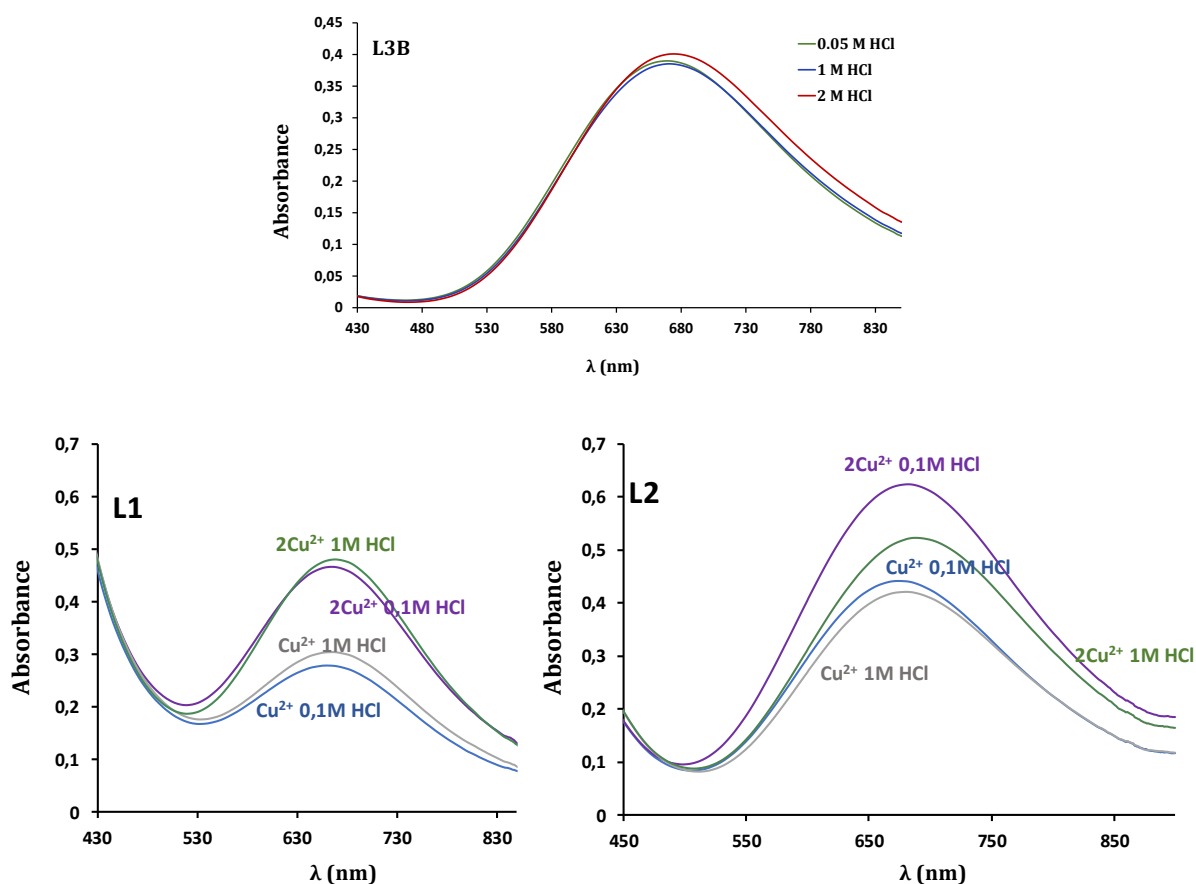


Figure II. 6 : Spectres d'absorption des complexes de Cu(II) avec $[L3B] = 3 \text{ mM}$, $[L1] = 1,56 \text{ mM}$, $[L2] = 2,5 \text{ mM}$ en présence de 1 ou 2 eq. de Cu(II) dans KCl 1M et à différentes concentrations de HCl.

En conclusion de ces études de stabilité, nous pouvons dire que l'ajout d'une fonction carboxylate supplémentaire a permis un gain de stabilité important pour les complexes de Gd(III). Si l'on compare les constantes de stabilité de **GdL1** ou **GdL2** avec celles des cations endogènes, nous pouvons dire que la partie « pyridine » est sélective du Gd(III). Ainsi en présence de Zn(II), le Zn(II) ne remplacera pas Gd(III) dans la partie « pyridine » mais viendra bien se complexer dans la partie DPA modifiée qui lui est dédiée. D'après les constantes de stabilité de **ZnL2**, nous pouvons calculer approximativement une constante d'affinité de **GdL** pour le Zn(II). Cette affinité se situera dans la gamme du nanomolaire, ce qui est compatible avec les concentrations de Zn(II) physiologiques. Enfin, comme de nombreuses unités complexantes basées sur la DPA, cette unité n'est pas très sélective pour le Zn(II) par rapport au Cu(II), mais comme *in vivo* le Cu(II) est présent en quantité beaucoup plus faible que le Zn(II), nous pouvons

conclure que la sélectivité pour le Zn(II) devrait être suffisante (voir plus bas) pour permettre une utilisation de ces ligands comme agents responsifs au zinc.

3.2. Propriétés magnétiques (Profil NMRD)

La relaxivité définit l'efficacité d'un agent de contraste. Il est important d'étudier l'évolution de la relaxivité en fonction de la température et du champ magnétique pour déterminer les paramètres régissant les processus dynamiques tels que le temps de corrélation rotationnelle pour de petites molécules. Ainsi, les profils ^1H NMRD (nuclear magnetic relaxation dispersion) ont été enregistrés pour **GdL1** et **GdL2** (**Figure II. 7**) à 25, 37 et 50°C.

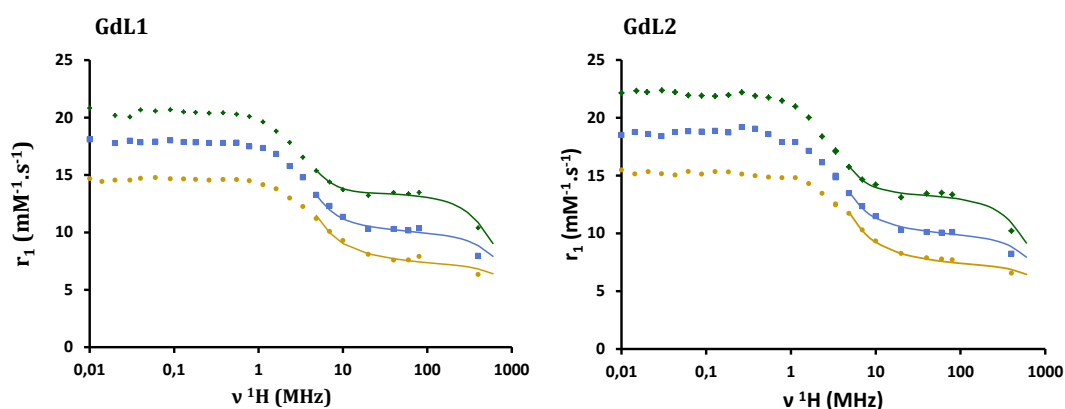


Figure II. 7 : Profils NMRD du **[GdL1] = 3,76 mM** et **[GdL2] = 0,298 mM** (dans l'HEPES 0,1M à pH=7,4) à 298 K (♦), 310 K (■) et 323 K (●). Les traits représentent le fit à la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan.

Ces profils montrent une diminution de la relaxivité de l'agent de contraste avec l'augmentation de la température et du champ. Ils sont similaires aux profils précédemment enregistrés pour de petites molécules [8]. Les valeurs obtenues sont donc en accord avec les structures des complexes.

Les données expérimentales ont été analysées à l'aide de la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan (**Equations en Annexe 5**) afin de déterminer les paramètres microscopiques pouvant influencer la relaxivité des complexes. Les résultats de ce fit pour les complexes **GdL1** et **GdL2** sont présentés **Figure 2.7** et dans le **tableau II. 3**.

Tableau II. 3 : Paramètres obtenus par le fit des données ^1H NMRD à différentes températures (298 K, 310 K, et 323 K) selon la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan.

	GdL1	GdL2	Gd26[7]	GdPy [11]
r_1 à 298 K à 20 MHz ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	13.3	13.4	12.1	9.3
q^a	2	2	2	2
$\Delta H^\ddagger$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	37 ^b	50.4 ^c	37	50.4
k_{ex} (10^6 s^{-1})	4.2 ^b	9.3 ^c	4.2	9.3
τ_{RH} (ps)	196(5)	185(5)	170	92 ^d
E_{R} ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	22 (2)	20(2)	26.1	20.2
τ_{v} (ps)	9.1(1)	9.4(1)	3.1	2.8
D_{GdH} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) à 298 K	27(1)	26(2)	26.8	nd ^e
$E_{D\text{GdH}}$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	12.8(2)	10.2(3)	15.0	nd ^e
Δ^2 (10^{20} s^{-1})	0.09(1)	0.08(1)	0.23	0.96

a) Fixé

b) Fixé à la valeur de **Gd26**

c) Fixé à la valeur de **GdPy**

d) τ_{RO} [ps]

e) Valeur non déterminée

Les fits sont effectués à partir de 4.8 MHz car à plus bas champ la relaxation électronique devient dominante et la théorie SBM pour décrire cette relaxation électronique n'est pas satisfaisante. Les paramètres électroniques τ_{v} et Δ^2 ne doivent donc pas être surinterprétés. Nous avons fixé les valeurs de k_{ex} et $\Delta H^\ddagger$ des complexes **GdL1** et **GdL2** à celles de **Gd26** et **GdPy** respectivement puisqu'ils ont la même sphère de coordination. Par conséquent, ils ont des k_{ex} et $\Delta H^\ddagger$ similaires. Les temps de corrélation rotationnel fittés des systèmes **GdL1** et **GdL2** sont cohérents avec la taille des complexes.

Par la suite, nous allons nous intéresser à l'influence du zinc sur ces paramètres microscopiques.

4. Etude de l'influence du Zn(II) sur les propriétés relaxométriques de LnL1 et LnL2

4.1. Influence du Zn(II) sur la relaxivité

Afin d'étudier l'influence du zinc sur les propriétés relaxométriques de nos complexes de Gd(III), leurs relaxivités en fonction de la concentration en Zn(II) ont été mesurées à 20 MHz et 298 K dans l'HEPES 0,1 M (pH = 7.4) (**Figure II. 8**).

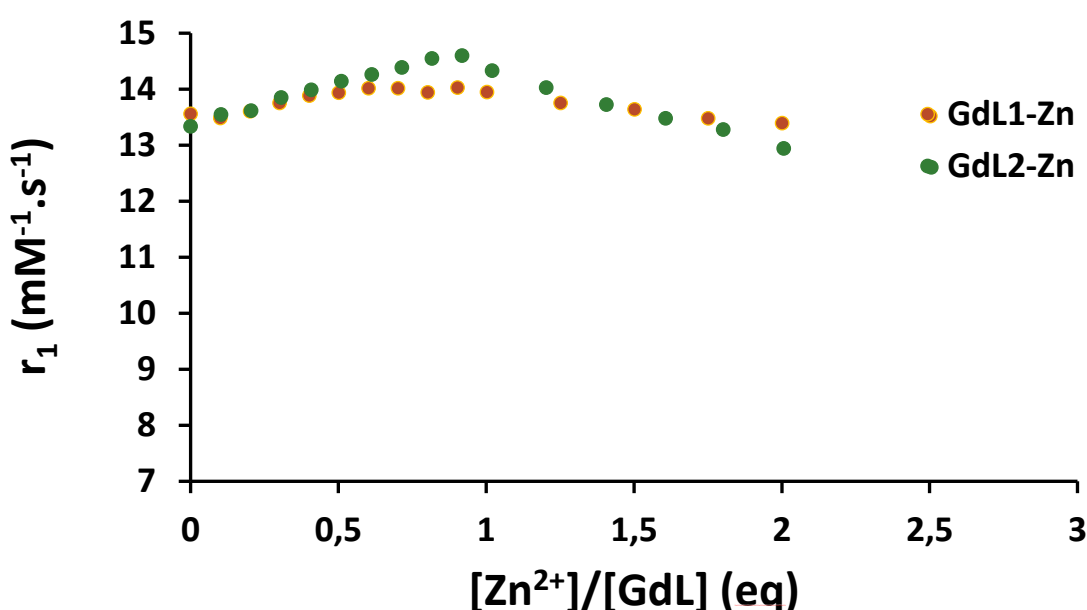


Figure II. 8 : Relaxivité des complexes **GdL1** à 3 mM et **GdL2** à 1 mM dans l'HEPES 0,1 M (pH=7,4) en fonction du ratio Zn(II)/Gd(III) à 20 MHz et 298 K.

Il n'y a pas de variation significative de la relaxivité en présence de Zn(II) pour **GdL1** et **GdL2**. Par conséquent, la présence de Zn(II) sur les complexes **GdL1** ou **GdL2** n'entraîne pas de modifications significatives des paramètres microscopiques de ces complexes. Ces résultats sont très différents de ce qui avait été observé pour **Gd26** (augmentation de 20% de la relaxivité à 0.5 équivalents de Zn(II) ajoutés expliquée par la formation de dimères).

Cependant, il est important de signaler une petite variation de la relaxivité en présence de Zn(II) pour le système **GdL2**. Afin d'éliminer la formation d'agrégats, une étude de la

variation de $R_{1\text{para}}$ en fonction de la concentration en **[GdL2-Zn]** a été envisagée (**Figure II. 9**).

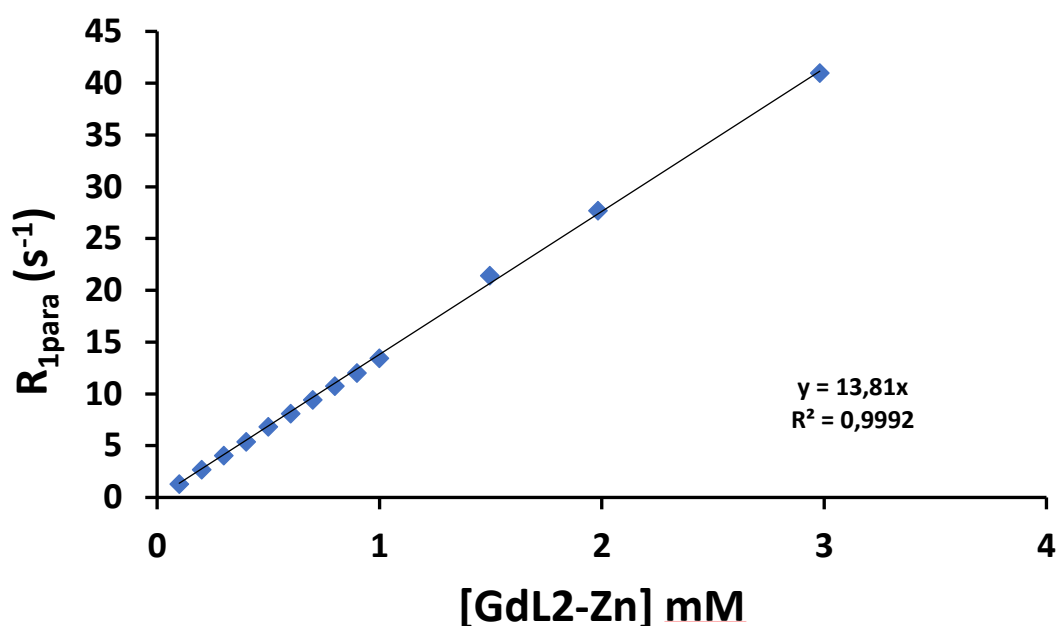


Figure II. 9 : Variation de $R_{1\text{para}}$ en fonction de la concentration en **GdL2-Zn**. Mesures effectuées à 298 K, 20 MHz dans l'HEPES 0,1M.

$R_{1\text{para}}$ varie linéairement avec la concentration de **GdL2Zn**, ce qui exclut la formation de gros agrégats. Ce petit changement de relaxivité, de l'ordre de 10%, pourrait être expliqué par un possible changement d'environnement dû à la complexation du Zn(II) : par exemple un repliement du complexe sur lui-même impliquant une petite augmentation du temps de corrélation rotationnel, ou une petite augmentation de la contribution de sphère externe, ou encore la possible présence de molécules d'eau en deuxième sphère de coordination.

Afin de rationaliser les résultats obtenus en présence de Zn(II), et de les comparer à ceux obtenus pour **Gd26** précédemment, nous nous sommes intéressés à la sphère d'hydratation du Gd(III) en présence et en absence de Zn(II), ainsi qu'à la formation de dimères.

4.2. Mesures de temps de vie de luminescence

Des mesures de temps de vie de luminescence ont été effectuées sur l'analogue **EuL2** en absence et en présence de Zn(II) dans H₂O et dans D₂O. Grâce à l'équation empirique de Parker [12] (**Equation II. 1**), on a pu calculer le nombre des molécules d'eau coordonnées sur le complexe **LnL2** en présence et en absence de Zn(II). Les résultats sont présentés dans le tableau II. 4. Ce système possède un nombre d'hydratation q égal à 2 en présence et en absence du zinc.

$$q = 1,2 \times \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - 0,25 \right) \quad \text{II.1.}$$

où τ représente le temps de vie de luminescence du complexe dans H₂O ou D₂O.

Tableau II. 4 : Temps de vie de luminescence et nombre d'hydratation des complexes Eu(III) avec et sans Zn(II).

	EuL2	EuL2-Zn
$\tau_{1/2} \text{ H}_2\text{O}$ (ms)	0.39 (1)	0.38 (1)
$\tau_{1/2} \text{ D}_2\text{O}$ (ms)	2.03 (1)	1.82 (1)
q	2.2 (3)	2.2 (3)

La première sphère de coordination du Ln(III) n'est donc pas modifiée par la complexation du Zn(II). Par conséquent, les groupements carboxylates ajoutés sur la partie ciblant pour Zn(II) ne coordonnent pas le Gd(III) en absence de Zn(II).

Cependant les petites variations de temps de vie observées sur les complexes en présence et en absence du Zn(II) peuvent signifier que l'environnement du cation métallique a subi quelques modifications et pourraient expliquer en partie les petites variations de relaxivité observées pour **GdL2**.

4.3. Influence du groupement chélatant du Zn(II) sur la relaxivité

Les agents de contraste **Gd26** et **Gd27** décrit précédemment par Bonnet et al [7] montrent une réponse au Zn(II) par variation de temps de corrélation rotationnelle avec formation d'un complexe dimérique. Cependant, le comportement est très différent pour **GdL1** ou **GdL2**. La différence majeure en terme de complexation du Zn(II) sur ces complexes est justement la partie chélatante de Zn(II) qui semblerait favoriser la formation de dimère dans le cas de **Gd26** et **Gd27**. Les composés modèles **L3A** et **L3B** miment les parties chélatantes du Zn(II) pour respectivement **Gd26**, **Gd27** et **GdL1**, **GdL2**. Nous avons donc réalisé des titrages potentiométriques du Zn(II) en présence de 1 et 2 équivalents de **L3A** ou **L3B**. Une partie des résultats est présentée dans le tableau II. 2 et les constantes de formation de dimère sont présentées dans le tableau ci-dessous. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau II. 5**.

Tableau II. 5 : Constantes de stabilité de composés modèles dans le KCl 0,1 M à 298 K.

	L3A	L3B
LogK_{ZnL₂}	5,52 (2)	3,8 (2)
Kcond à pH 7,4	4,35	1,67

La constante de formation d'espèces dimériques est environ 2 ordres de grandeur supérieure dans le cas de **L3A** par rapport à **L3B**. Grâce à ces résultats, nous avons simulé les courbes de spéciations (**Figure II. 10A et 10B**) des espèces présentes dans le milieu et ainsi calculé les constantes conditionnelles à pH physiologique (**Tableau II. 5, Equilibre II.1**). Ces courbes de spéciations nous indiquent que le système dimérique est favorisé à pH 7,4 pour le système **L3A** par rapport au **L3B**.



Cela se traduit par une différence d'environ 3 ordres de grandeur entre les constantes conditionnelles de **L3A₂Zn** ($\log K_{\text{cond}} = 4,35$) et **L3B₂Zn** ($\log K_{\text{cond}} = 1,67$). Ceci veut bien dire que la formation de dimère est négligeable quand le groupe complexant de Zn(II) est issu de **L3B**, ce qui confirme le comportement observé pour **GdL1** et **GdL2** lors de la détection de Zn(II).

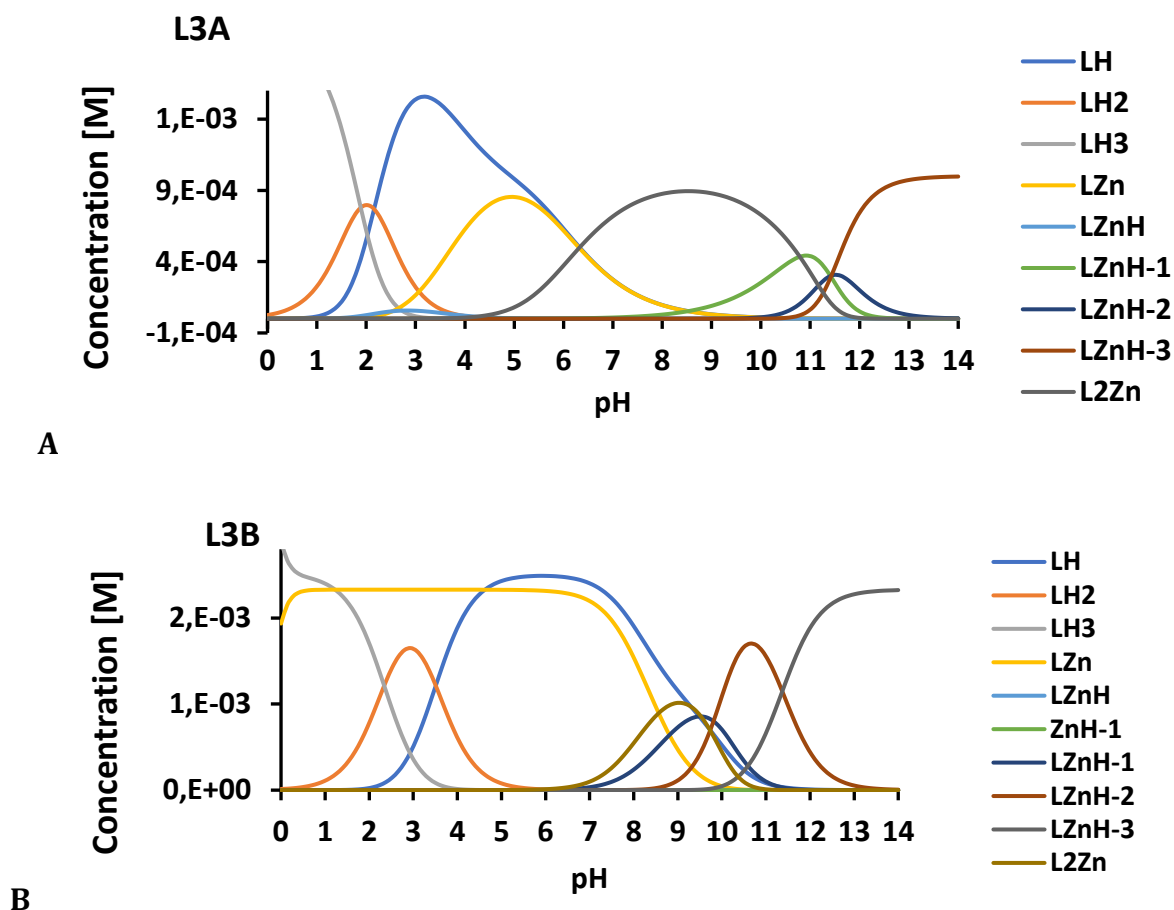


Figure II. 10 : Courbes de spéciation des espèces présentes en solution A (**L3A**) et B (**L3B**).

5. Détection de Zn(II) en présence de HSA

5.1. Introduction sur la HSA

L'albumine sérique humaine (Humain Serum Albumin HSA en anglais) est la protéine la plus abondante du plasma sanguin. Elle est capable d'interagir avec un grand nombre de molécules endogènes et exogènes [13]. Elle peut ainsi modifier fortement les propriétés pharmacocinétiques d'un médicament, comme sa solubilité, sa métabolisation et sa

biodistribution. L'étude de l'interaction entre un médicament et la HSA est donc capitale pour estimer son comportement *in vivo*.

Sudlow, le pionnier dans le domaine d'études d'interactions de la HSA avec des petites molécules, a identifié en 1975 deux familles de molécules pouvant interagir avec la HSA. La plupart sont des acides carboxyliques, qui peuvent interagir avec deux sites distincts sur l'albumine, appelés site 1 et site 2 [14,15]. Depuis, la HSA a été longuement étudiée et sa structure élucidée. Elle est composée de trois domaines structuralement similaires (I, II et III), chacun étant lui-même divisé en deux sous-domaines A et B. Les sites d'interactions 1 et 2 ont été localisés sur les sous-domaines IIA et IIIA respectivement [13,16,17], (**Figure III. 7**). D'autres sites pouvant lier des acides gras ou des ions métalliques ont été identifiés ainsi que de multiples sites secondaires non spécifiques [13,18,19].

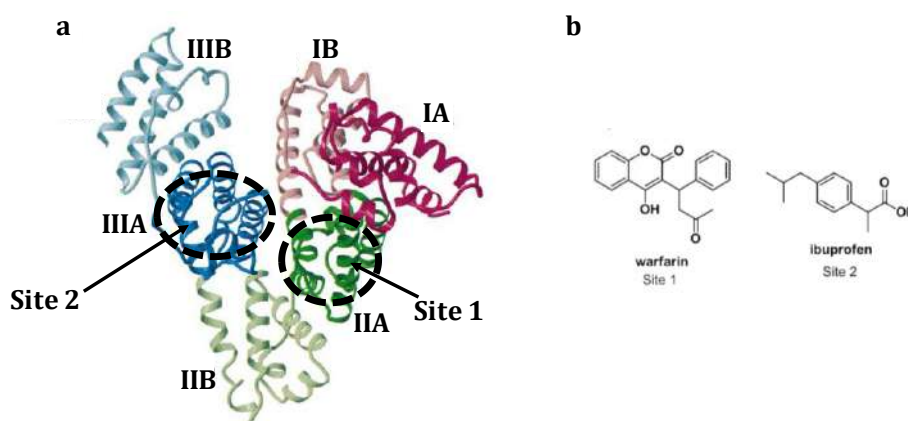


Figure III. 7 : a) Structure cristallographique de la HSA [17] et b) ses ligands warfarine et ibuprofène.

La plupart des ligands de la HSA sont des molécules globalement hydrophobes présentant une partie hydrophile, le plus souvent une fonction acide carboxylique. Les sites d'interaction sont des poches hydrophobes où les ligands peuvent s'insérer alors que les fonctions acides chargées négativement peuvent interagir avec des résidus cationiques à la surface de la protéine. La diversité structurale des ligands de la HSA ne permet pas d'établir une relation structure-activité claire pour rationaliser leur conception. Cependant, devant la quantité de ligands étudiés, un certain nombre de règles généralement vérifiées ont pu être dégagées. Les ligands du site 1 sont des acides dicarboxyliques et/ou des molécules hétérocycliques encombrantes avec une charge

négative centrale et souvent délocalisée (type Warfarine **Figure III. 7 b**) tandis que les ligands du site 2 présentent des structures aromatiques avec une charge négative éloignée du centre aromatique, souvent située à l'une des extrémités (type Ibuprofène **Figure III. 7b**) [13].

Sherry et ses collaborateurs ont étudié l'interaction entre le complexe **Gd18** et la HSA en absence et en présence de Zn(II) [20]. Pour cela, des titrations compétitives en présence d'un ligand du site 1 (Warfarine) et d'un ligand du site 2 (Dansylglycine) ont été effectuées. Ces études ont montré que le complexe **Gd18** se lie à la HSA dans le site 2 du sous domaine IIIA. En effet, l'entrée du site 2 n'est pas encombrée ce qui permet au complexe **Gd18** d'interagir facilement avec la HSA. Quant à Chen *et al.*, ils ont montré que leurs complexes responsifs au Zn(II) interagissent avec la HSA sur les sites 1 et 2 [21].

Notre but ici est de quantifier les interactions et les réponses au Zn(II) sur une famille de molécule et d'essayer de rationaliser les résultats obtenus en termes de structure. Dans le chapitre 2, nous avons remarqué que **GdL2** possédait également une réponse au Cu(II) importante, nous avons donc décidé d'ajouter le Cu(II) dans ces études afin de comprendre comment la sélectivité Zn(II) vs Cu(II) ou vice versa en présence de HSA peut être reliée à la structure du complexe.

5.2. Relaxivité en présence de HSA

Il est intéressant de connaître les interactions entre les protéines contenues dans le sérum et les agents de contraste. L'albumine sérique est la protéine la plus abondante dans le sang. Dans ce cadre, nous avons donc étudié l'influence de Zn(II) sur les propriétés magnétiques de nos systèmes en présence de HSA (Human Serum Albumin). La **figure II. 11** présente les profils ^1H NMRD des complexes **GdL1**, **GdL1-Zn**, **GdL2** et **GdL2-Zn** en présence de HSA à concentration physiologique 0.6 mM.

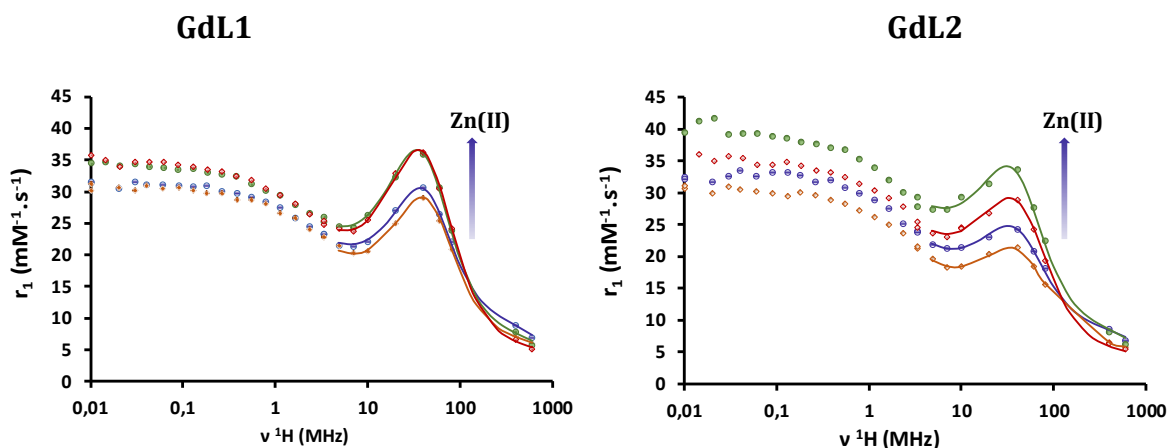


Figure II. 11 : Profil ^1H NMRD des complexes $[\text{GdL1}] = 0,381 \text{ mM}$, $[\text{GdL2}] = 0,362 \text{ mM}$ (à 298 K $\bullet$ et 310 K $\blacklozenge$) et complexes $[\text{GdL1-Zn}] = 0,362 \text{ mM}$ $[\text{GdL2-Zn}] = 0,362 \text{ mM}$ (à 298 K $\bullet$ et 310 K $\blacklozenge$) en présence de HSA. Les traits représentent les fits obtenus avec la théorie SBM et intégrant l'approche Lipari-Szabo.

Ces profils montrent une bosse à haut champs (entre 10-80 MHz). Cette allure est caractéristique des molécules à rotation lente, démontrant ainsi la présence d'interaction de nos complexes avec la HSA en présence et en absence de Zn(II). En effet, les complexes possèdent des parties hydrophobes qui sont susceptibles d'interagir avec la HSA. Ces résultats montrent également une réponse significative au Zn(II) en présence de la HSA. Effectivement, une augmentation de la relaxivité d'environ 35 % est obtenue pour le complexe **GdL1** et 25 % pour **GdL2** par l'ajout de Zn(II) en présence de HSA à 20 MHz à 37° C. Le système **GdL1** semble mieux répondre au zinc en présence de HSA par rapport à **GdL2**. Cependant, les valeurs de relaxivité sont plus élevées pour **GdL2**.

Afin de rationaliser plus finement ces effets, nous nous sommes intéressés d'abord à l'affinité de ces complexes pour la HSA, puis à la détermination des différents paramètres microscopiques.

5.3. Affinité des complexes pour la HSA

Deux types de dosages ont été effectués pour chaque complexe. Les résultats sont présentés dans la **figure II. 12**. Dans un premier temps, des titrages A (**GdL1** et **GdL1-Zn**) et B (**GdL2** et **GdL2-Zn**) sont effectués en gardant la concentration en HSA

(physiologique 0,6 mM) constante et seule la concentration en complexe varie (titrage M). Les courbes C et D ont été obtenues en gardant la concentration des complexes constante, et en faisant varier la concentration de HSA (titrage E).

D'abord, ces résultats confirment encore une fois qu'il est possible de détecter le Zn(II) avec ces complexes en présence de HSA. Sur les titrages M, même à 3 mM de **GdL** ou **GdL-Zn**, nous n'observons pas de saturation des courbes qui indiquerait que tous les sites d'interaction disponibles sur la HSA sont saturés. Or, cette concentration correspond à 5 fois la concentration de la HSA physiologique. Par conséquent, il existe au moins 5 sites d'interaction entre nos complexes et la HSA.

Ceci est cohérent avec des études précédentes concernant l'interaction de complexes métalliques avec la HSA sans acides gras (defatted HSA) [22]. Bien que le nombre de sites précis d'interaction avec la HSA ne soit pas connu, il semble y avoir deux ou trois sites de forte affinité, et au moins 3 sites de plus faible affinité. Il a également été montré que la HSA sans acide gras semblait avoir 3 sites d'interaction supplémentaires par rapport à la HSA avec acides gras [22]. Devant la complexité des interactions de nos systèmes avec la HSA, il est délicat de déterminer une équation prenant compte tous les sites d'interactions. Nous avons donc décidé de déterminer l'affinité du site de plus forte affinité en utilisant l'équation **II. 2**, et en faisant un fit en présence d'un excès de HSA par rapport au complexe. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure II. 12 C, D et le tableau II. 6**.

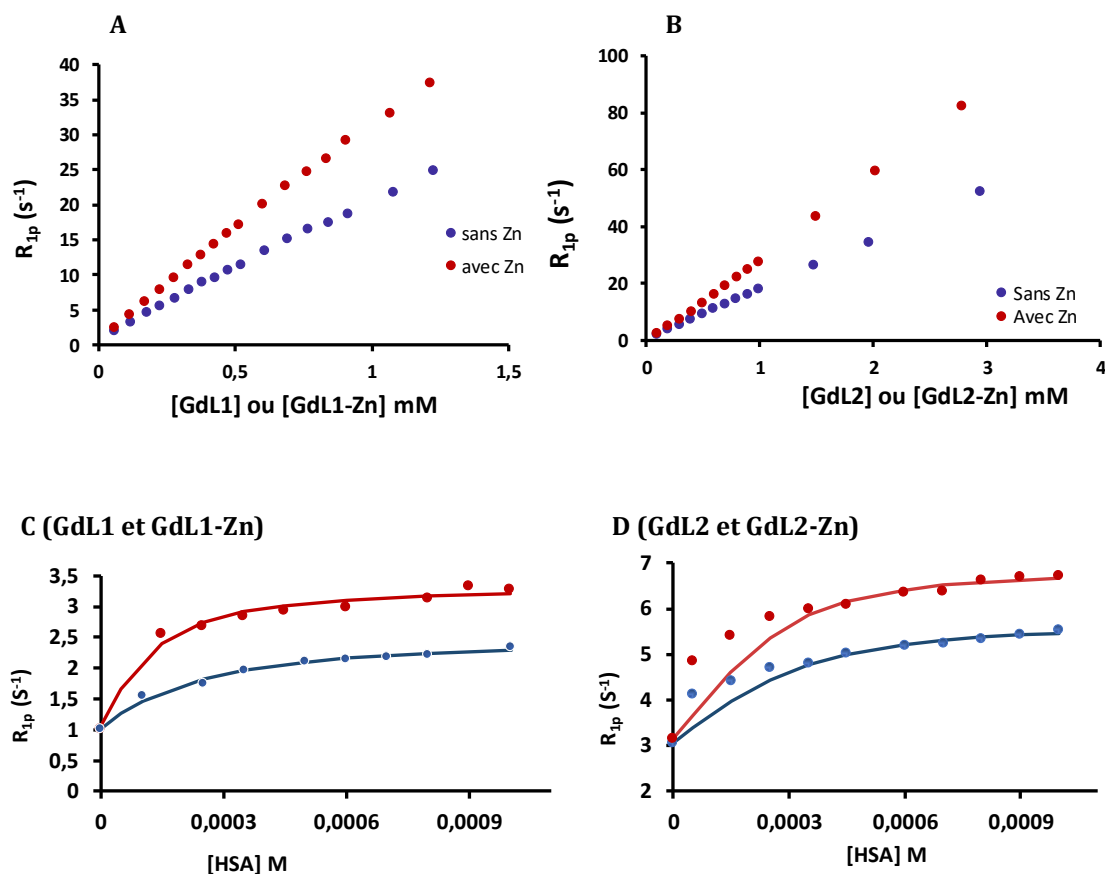


Figure II. 12 : A (pour **L1**) et B (pour **L2**) Titration M : Augmentation paramagnétique du taux de relaxation en fonction de la concentration en complexes **GdL1** et **GdL2** en bleu, **GdL1-Zn** et **GdL2-Zn** en rouge à 310 K et à 20 MHz, dans l'HEPES (0,1 M, pH 7,4) et $[HSA]_{\text{constante}} = 0,6$ mM. C (pour **L1**) et D (pour **L2**) Titration E : Augmentation paramagnétique du taux de relaxation en fonction de la concentration en HSA avec $[GdL1 \text{ et } GdL1-Zn]_{\text{constante}} = 0,1$ mM, et $[GdL2 \text{ et } GdL2-Zn]_{\text{constante}} = 0,3$ mM à 310 K et à 20 MHz, dans l'HEPES (0,1 M, pH 7,4). Les traits représentent les fits suivant l'équation II. 2. Détermination du site de plus forte affinité (fit en excès de HSA).

$$R_1^{pobs} = 10^3 \times \left\{ \begin{array}{l} (r_1^f \cdot c_1) + \frac{1}{2}(r_1^b - r_1^f) \times \\ \left(c_{HSA} + c_1 + K_A^{-1} - \sqrt{(c_{HSA} + c_1 + K_A^{-1})^2 - 4 \cdot c_{HSA} \cdot c_1} \right) \end{array} \right. \quad \text{II. 2}$$

où r_1^f et r_1^b représentent la relaxivité du complexe dans l'état libre et lié respectivement ; c_1 et c_{HSA} les concentrations de complexe et HSA respectivement et $K_A = 1/K_d$ la constante d'affinité.

Une affinité d'environ 170 μM pour **GdL1-HSA** et 100 μM pour **GdL2-HSA** sont obtenues en absence de Zn(II). Notons que ces affinités restent non négligeables. En revanche, ces affinités augmentent d'un facteur 2-3 en présence de Zn(II). Les affinités obtenues en présence de zinc restent similaires pour les deux systèmes. Ainsi, cette variation des affinités en présence et en absence de zinc donne une idée sur la réponse au zinc mais n'explique en aucun cas la différence de la réponse au zinc pour les deux systèmes **GdL1** et **GdL2**.

Tableau II. 6 : Constantes de dissociation ($K_d = K_A$) obtenues pour le site de plus forte affinité (fit en excès de HSA).

	$K_d \mu\text{M}$
GdL1-HSA	170(40)
GdL2-HSA	100(20)
GdL1-Zn-HSA	60(20)
GdL2-Zn-HSA	50(15)
Gd18-Zn-HSA [20]	42

Si l'on compare les affinités de nos systèmes avec ceux de la littérature et en l'occurrence **Gd18** développé par Sherry et ses collaborateurs (le complexe n'a pas d'affinité pour la HSA en absence de zinc, et une affinité de 42 μM est obtenue en présence de Zn(II)) [20], on remarque que les affinités en présence de zinc sont similaires. Par contre les affinités en absence de Zn(II) sont beaucoup plus élevées dans notre cas. Ceci pourrait être une conséquence de l'ajout des fonctions carboxylates sur la DPA. En absence de Zn(II) les complexes **GdL1** et **GdL2** sont négativement chargés, alors que le complexe **Gd18** est chargé +1. Ces différences de charge pourraient expliquer les différences d'affinité observées.

5.4. Analyse des courbes NMRD

5.4.1. Détermination de q

Dans l'objectif de comprendre l'origine de la différence de la variation de la réponse au Zn(II) en présence de HSA entre **GdL1** et **GdL2**, des mesures de temps de vie de luminescence ont également été effectuées et les résultats sont présentés dans le **tableau II. 7**.

Tableau II. 7 : Mesures de temps de vie de luminescence sur le complexe EuL2

	EuL2-HSA	EuL2-Zn-HSA	EuL2	EuL2-Zn
$\tau_{1/2}$ H2O (ms)	0,40(1)	0,43(1)	0,39(1)	0,38(1)
$\tau_{1/2}$ D2O (ms)	1.45(1)	1.42(1)	2.03(1)	1.82(1)
q	1.7(5)	1.5(5)	2.2(3)	2.2(3)

On remarque une petite variation du temps de vie de luminescence qui implique l'existence d'une modification de l'environnement autour de l'Eu(III), mais qui ne se traduit pas par un changement important du nombre d'hydratation. Il est cependant intéressant de noter que le nombre d'hydratation diminue sensiblement en présence d'HSA. Nous pouvons donc conclure que la réponse au zinc en présence de HSA n'est pas liée à une variation du nombre d'hydratation du complexe.

5.4.2. Fits par l'approche Lipari-Szabo

Un ajustement des profils de nos systèmes en présence de la HSA par la théorie SBM en intégrant l'approche Lipari-Szabo a été effectué. Les résultats obtenus sont résumés dans la **figure II. 13**, **tableau II. 8** et les équations sont données en **Annexe 6**. Cette approche est utilisée pour l'ajustement des systèmes macromoléculaires et prend en compte la rotation globale du système, ainsi qu'un mouvement local du complexe de Gd(III). La dynamique de rotation du système va donc être décrite par les paramètres

suivants : τ_l qui définit le temps de corrélation rotationnel local au niveau du Gd(III), τ_g , lui caractérise le temps de corrélation rotationnel global du système macromoléculaire et S^2 qui est un paramètre d'ordre lié à la rigidité. Il est important de noter que plus S^2 tend vers 1 plus le système est rigide et plus il tend vers 0, plus les rotations locales et globales sont décorréliées. Notons que pour chaque temps de corrélation rotationnel τ_l et τ_g correspond une énergie E_l et E_g respectivement.

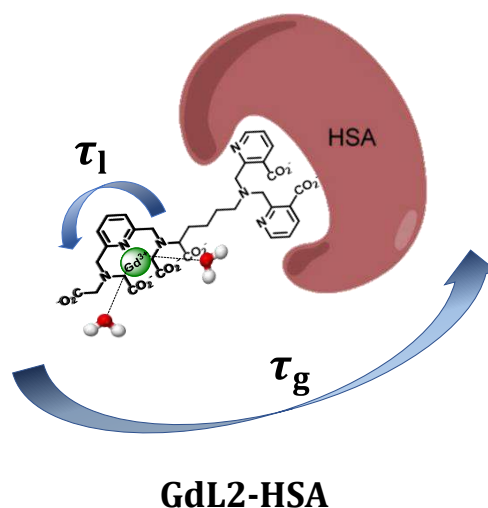


Figure II. 13 : Illustration des paramètres microscopiques importants dans l'approche Lipari-Szabo.

Comme précédemment, les paramètres de relaxation électronique ne doivent pas être surinterprétés car les fits ont été restreints aux champs supérieurs à 4.8 MHz. D'après le **tableau II. 8**, les valeurs de τ_l et τ_g sont du même ordre de grandeur pour **GdL1-HSA**, **GdL1-Zn-HSA**, **GdL2-HSA** et **GdL2-Zn-HSA**. Cela est tout à fait en accord avec la similarité de la taille des molécules. En revanche, le paramètre lié à la rigidité S^2 augmente quand on ajoute le Zn(II). Les systèmes sont plus rigides en présence de Zn(II), expliquant les augmentations de relaxivité observées dans ces conditions et la détection possible du Zn(II). Si l'on regarde plus en détail, on note également que S^2 augmente quand on passe du système **GdL2-HSA** à **GdL1-HSA** et **GdL2-Zn-HSA** à **GdL1-Zn-HSA**. Ceci signifie que les systèmes contenant **L1** sont toujours plus rigides que ceux contenant **L2**. Ceci peut s'expliquer par la taille et la nature du linker qui diffère fortement entre **L1** et **L2**.

Tableau II. 8 : Valeurs des paramètres après fit avec l'approche Lipari-Szabo

	GdL1-HSA	GdL1-Zn-HSA	GdL2-HSA	GdL2-Zn-HSA
q^a	2	2	2	2
$\Delta H^\ddagger$ (kJ.mol ⁻¹)	37 ^b	37 ^b	50 ^c	50 ^c
k_{ex} (10 ⁶ s ⁻¹) à 298 K	4,2 ^b	4,2 ^b	9,3 ^c	9,3 ^c
E_g (kJ.mol ⁻¹)	12	12	12	15
τ_g (ps) à 298 K	3500(300)	3500(200)	3000(300)	3200(400)
E_l (kJ.mol ⁻¹)	25(8)	24(5)	24(5)	36(13)
τ_l (ps) à 298 K	183(10)	150(11)	143(7)	160(15)
E_v (kJ.mol ⁻¹) ^c	1	1	1	1
τ_v (ps)	9.1(0.7)	10.5(0.6)	8.2(0.9)	8(1)
Δ^2	0.075(1)	0.075(5)	0.068(7)	0.064(1)
S^2	0.25(1)	0.34(1)	0.16(1)	0.24 (1)

a. Fixé

b. Fixé à la valeur de **Gd26** [7];c. Fixé à la valeur de **GdPy** [11]

5.5. Sélectivité par rapport aux cations biologiques

Pour s'intéresser à la détection du Zn(II), et à fortiori de façon quantitative, il faut étudier la sélectivité de l'entité complexante du Zn(II) en présence de la HSA. Les études potentiométriques nous ont donné de premiers éléments de réponse, mais nous avons également réalisé des mesures de sélectivité par relaxométrie. Les études ont été faites sur le complexe **GdL2** en présence de la HSA et de cations physiologiques notamment le Ca(II), le Mg(II) et le Cu(II). La concentration en complexe étant de 0,3 mM, elle reste inférieure à la concentration physiologique de la HSA qui est de 0,6 mM. Ces mesures ont été effectuées à 20 MHz et à 310 K avec 1 équivalent de Cu(II), Ca(II) et Mg(II). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure II. 14**.

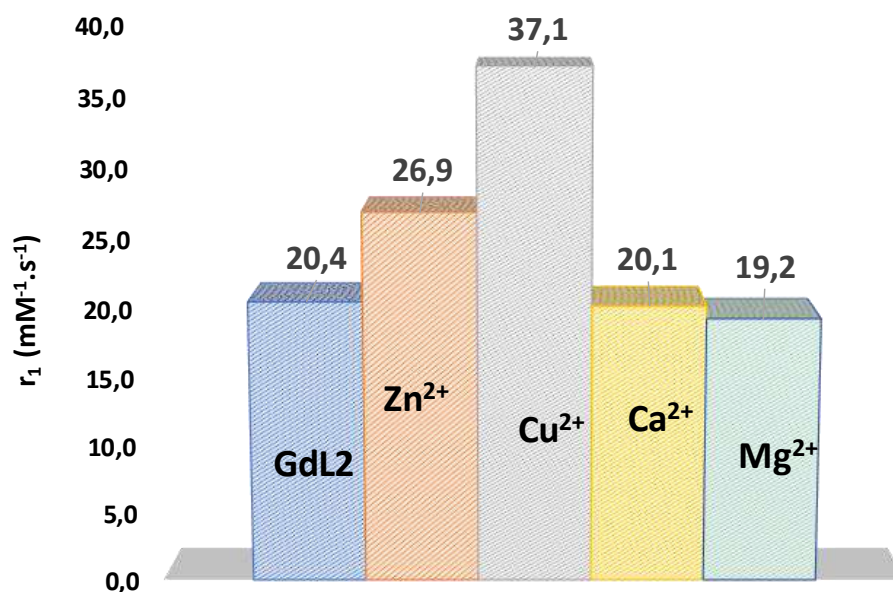


Figure II. 14 : Comparaison des relaxivités mesurées à 20 MHz et 310 K pour le complexe **GdL2** (0,3 mM) en présence de HSA (0,6 mM) et 1 équivalent de cation endogène dans l'HEPES 0,1 M, pH 7,4.

Comme attendu, avec Ca(II) et Mg(II), aucune variation de relaxivité du système **GdL2** n'est observée. En revanche, une augmentation de la relaxivité de 82 % est observée en présence d'un équivalent de Cu(II) par rapport au complexe **GdL2-HSA**. Une telle réponse a déjà été observée avec d'autres agents de contraste responsifs au Zn(II) en présence de HSA [20]. Cependant, il faut noter que, *in vivo*, la concentration en Cu(II) est très faible par rapport à celle de Zn(II) [20]. A titre d'exemple, dans les fentes synaptiques la concentration de Cu(II) est de 15 μM vs 300 μM pour Zn(II) [23], dans la prostate 7-50 nmol/g pour Cu(II) contre 3000-10000 nmol/g pour Zn(II) [24] et dans le pancréas, pour les chiens la concentration de Cu(II) est de 2 $\mu\text{g/g}$ contre 88 $\mu\text{g/g}$ pour Zn(II) [25]. Cela ne devrait pas entraîner d'erreurs trop importantes (inférieure ou égale à 10 %) dans la détermination quantitative de la concentration de Zn(II). Par conséquent, la sélectivité obtenue pour le Zn(II) est satisfaisante et nous permettra de réaliser une quantification du Zn(II) fiable (cf chapitre 5).

6. Conclusions et perspectives

Le but de ce chapitre était de synthétiser des ligands ayant une bonne stabilité thermodynamique pour le Gd(III) et permettant de complexer le Zn(II). Nous avons montré qu'une augmentation de stabilité importante a été apportée en remplaçant la fonction amide du ligand **L1** par un groupement carboxylate sur le ligand **L2**. Nous avons également montré qu'avec la modification de l'unité complexante du Zn(II), nous n'obtenions plus une réponse au Zn(II) par formation de dimère, qui se traduisait par une réponse non monotone.

Les systèmes développés répondent au Zn(II) en présence de HSA. Une augmentation de relaxivité de 25 % pour **GdL2** et 35 % pour **GdL1** a été observée par ajout de Zn(II) en présence de HSA. Nous avons pu montrer que l'ajout de Zn(II) permettait d'augmenter l'affinité de nos complexes pour la HSA expliquant les réponses obtenues. Enfin, par un ajustement des données utilisant l'approche Lipari-Szabo, nous avons pu montrer que les différences observées entre les systèmes **GdL1** et **GdL2** étaient dues à la nature du linker qui implique plus de rigidité au complexe **GdL1**.

Même si une réponse relaxométrique au Cu(II) a également été observée, nous avons pu noter une bonne sélectivité pour le zinc par rapport aux autres cations endogènes.

Développer un système comportant un linker court permettrait d'augmenter encore la rigidité en présence de la HSA et ainsi augmenter la réponse au Zn(II). Il serait également important de diminuer l'affinité pour la HSA en absence de Zn(II) et diminuer la réponse au Cu(II) pour augmenter la sélectivité pour le Zn(II). Une piste plausible serait d'enlever les carboxylates sur la DPA.

7. Bibliographie

1. Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Tóth, É. Pyridine-based lanthanide complexes: towards bimodal agents operating as near infrared luminescent and MRI reporters. *Chem. Commun.* **2008**, 6591, doi:10.1039/b817343e.
2. Romary, J.K.; Barger, J.D.; Bunds, J.E. New multidentate .alpha.-pyridyl ligand. Coordination of bis(2-pyridylmethyl)amine with transition metal ions. *Inorg. Chem.* **1968**, 7, 1142–1145, doi:10.1021/ic50064a018.
3. Giraud, M.; Andreiadis, E.S.; Fisyuk, A.S.; Demadrille, R.; Pécaut, J.; Imbert, D.; Mazzanti, M. Efficient sensitization of lanthanide luminescence by tetrazole-based polydentate ligands. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 3952–3954.
4. Wei, Z.; Xie, X.; Zhao, J.; Huang, L.; Liu, X. A novel hexadentate ligand and its complexes with divalent metal ions (Zinc, Copper, and Cobalt): Synthesis, characterization, and electrochemical investigation. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, 387, 277–282, doi:10.1016/j.ica.2012.01.032.
5. Suarez, D.; Laval, G.; Tu, S.-M.; Jiang, D.; Robinson, C.; Scott, R.; Golding, B. Benzylic Brominations with N-Bromosuccinimide in (Trifluoromethyl)benzene. *Synthesis* **2009**, 2009, 1807–1810, doi:10.1055/s-0029-1216793.
6. Yajima, T.; Okajima, M.; Odani, A.; Yamauchi, O. Attractive ligand–ligand interactions involving aromatic rings in five-coordinate ternary copper(II) complexes with a dipeptide and a bidentate N-donor ligand. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, 339, 445–454, doi:10.1016/s0020-1693(02)01039-3.
7. Bonnet, C.S.; Caillé, F.; Pallier, A.; Morfin, J.-F.; Petoud, S.; Suzenet, F.; Tóth, É. Mechanistic Studies of Gd³⁺-Based MRI Contrast Agents for Zn²⁺ Detection: Towards Rational Design. *Chem. - Eur. J.* **2014**, 20, 10959–10969, doi:10.1002/chem.201403043.
8. Paul-Roth, C.; Raymond, K.N. Amide Functional Group Contribution to the Stability of Gadolinium(III) Complexes: DTPA Derivatives. *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 1408–1412, doi:10.1021/ic00110a019.
9. Lacoste, R.G.; Christoffers, G.V.; Martell, A.E. New Multidentate Ligands. II. Amino Acids Containing α -Pyridyl Groups^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 2385–2388, doi:10.1021/ja01089a015.
10. Bonnet, C.S.; Laine, S.; Buron, F.; Tircsó, G.; Pallier, A.; Helm, L.; Suzenet, F.; Tóth, É. A Pyridine-Based Ligand with Two Hydrazine Functions for Lanthanide Chelation: Remarkable Kinetic Inertness for a Linear, Bishydrated Complex. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 5991–6003, doi:10.1021/acs.inorgchem.5b00804.
11. Roca-Sabio, A.; Bonnet, C.S.; Mato-Iglesias, M.; Esteban-Gómez, D.; Tóth, É.; Blas, A. de; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C. Lanthanide Complexes Based on a Diazapyridinophane Platform Containing Picolinate Pendants. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 10893–10903, doi:10.1021/ic301369z.
12. Beeby, A.; Clarkson, I.M.; Dickins, R.S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A.S.; Williams, J.A.G.; Woods, M. Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 493–504, doi:10.1039/a808692c.
13. Kragh-Hansen, U.; Chuang, V.T.G.; Otagiri, M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695–704, doi:10.1248/bpb.25.695.

14. WADE, D.; SUDLOW, G.; BIRKETT, D. CHARACTERIZATION OF 2 SPECIFIC DRUG BINDING-SITES ON HUMAN-SERUM ALBUMIN. In Proceedings of the CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY; BLACKWELL SCIENCE 54 UNIVERSITY ST, PO BOX 378, CARLTON VICTORIA 3053, AUSTRALIA, 1975; Vol. 2, pp. 449–449.
15. Sudlow, G.; Birkett, D.J.; Wade, D.N. Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052–1061.
16. Dockal, M.; Carter, D.C.; Rüker, F. The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND LIGAND BINDING PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303–29310, doi:10.1074/jbc.274.41.29303.
17. Curry, S.; Brick, P.; Franks, N.P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, *1441*, 131–140, doi:10.1016/S1388-1981(99)00148-1.
18. Lu, J.; Stewart, A.J.; Sadler, P.J.; Pinheiro, T.J.T.; Blindauer, C.A. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1317–1321, doi:10.1042/BST0361317.
19. Stewart, A.J.; Blindauer, C.A.; Berezenko, S.; Sleep, D.; Sadler, P.J. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3701–3706, doi:10.1073/pnas.0436576100.
20. Esqueda, A.C.; López, J.A.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzón, J.C.; Ratnakar, J.; Lubag, A.J.M.; Sherry, A.D.; De León-Rodríguez, L.M. A New Gadolinium-Based MRI Zinc Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11387–11391, doi:10.1021/ja901875v.
21. Xu, Y.-Q.; Luo, J.; Chen, Z.-N. Zn ²⁺ -Responsive Bimodal Magnetic Resonance Imaging and Fluorescence Imaging Agents and Their Interaction with Human Serum Albumin: Zn ²⁺ -Responsive Bimodal Imaging Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014*, 3208–3215, doi:10.1002/ejic.201402197.
22. Gianolio, E.; Giovenzana, G.B.; Longo, D.; Longo, I.; Menegotto, I.; Aime, S. Relaxometric and Modelling Studies of the Binding of a Lipophilic Gd-AAZTA Complex to Fatted and Defatted Human Serum Albumin. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13*, 5785–5797, doi:10.1002/chem.200601277.
23. Faller, P.; Hureau, C. Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide. *Dalton Trans* **2009**, 1080–1094, doi:10.1039/B813398K.
24. Denoyer, D.; Clatworthy, S.A.S.; Masaldan, S.; Meggyesy, P.M.; Cater, M.A. Heterogeneous copper concentrations in cancerous human prostate tissues: Copper Status in Prostate Cancer Patients. *The Prostate* **2015**, *75*, 1510–1517, doi:10.1002/pros.23022.
25. Adamama-Moraitou, K.; Rallis, T.; Papasteriadis, A.; Roubies, N.; Kaldrimidou, H. Iron, Zinc, and Copper Concentration in Serum, Various Organs, and Hair of Dogs with Experimentally Induced Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Dig. Dis. Sci.* **2001**, *46*, 1444–1457, doi:10.1023/A:1010635820071.

Chapitre III

Etude structurale de la réponse au Zn(II) par variation de τ_R en présence de HSA

Table des matières

1. Introduction	144
2. Synthèse et études du ligand L4	145
2.1. Synthèse du ligand L4	145
2.1.1. 1 ^{ère} stratégie de synthèse.....	145
2.1.2. 2 ^{ème} stratégie de synthèse	150
2.1.3. Adaptation de la 2 ^{ème} stratégie de synthèse	152
2.2. Etude de la réponse de GdL4 au Zn(II)	154
2.2.1. Etude de la stoechiométrie des complexes LnL4	154
2.2.2. Détection du Zn(II) par relaxométrie	155
3. Synthèse de L5	157
4. Optimisation de la réponse aux cations métalliques en présence de HSA	158
4.1. Etude de l'affinité des complexes pour la HSA	158
4.2. Etude des Profils NMRD	161
5. Conclusions et perspectives	167
6. Bibliographie	169

1. Introduction

L'émergence de l'imagerie moléculaire, nécessitant l'utilisation de sondes spécifiques du processus à détecter, a conduit à la conception de nouveaux agents de contraste IRM à base de Gd(III) pour la détection de Zn(II) [1–6]. La relaxivité de ces agents est influencée principalement par q , le nombre de molécules d'eau coordonnées au centre Gd(III) et τ_r , le temps de corrélation rotationnel du complexe et la détection de Zn(II) est basée sur la variation de l'un de ces paramètres.

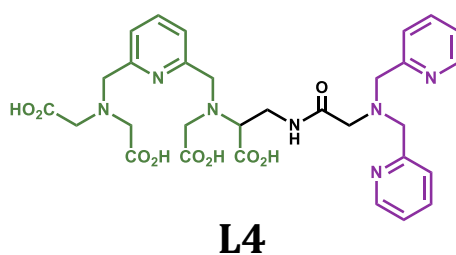


Figure III. 1 : Structure du ligand **L4**

Nous cherchons à obtenir une réponse au Zn(II) par variation de q . Néanmoins, dans les chapitres précédents, nous avons vu qu'il était difficile de prévoir comment l'interaction avec le Zn(II) influence le nombre d'hydratation. Une collaboration a donc été mise en place avec le docteur Carlos Platas-Iglesias de l'Université de la Corogne en Espagne qui réalise des calculs DFT. Sur la base du spectre RMN du complexe **YbPy**, la structure d'une molécule cible (ligand **L4** **Figure III. 1**) pouvant présenter une variation de q par complexation du Zn(II) a été définie. Ce ligand possède une partie complexante de Gd(III) identique à celle de **L2** décrite dans le chapitre 2. La partie chélatante de Zn(II) a été modifiée et est basée uniquement sur la DPA. Enfin, une fonction amide a été incorporée dans la chaîne alkyle. Les calculs DFT prédisent une réponse au Zn(II) par variation de q liée à la présence de l'amide : en effet, l'oxygène de l'amide peut coordonner Gd(III) en absence de Zn(II), puis quand le Zn(II) est présent se décoordiner du Gd(III) pour compléter la sphère de coordination du Zn(II). Ceci se traduit par une augmentation de q par ajout de Zn(II). Ce ligand possède également un proton labile sur l'amide qui peut être exploité pour la détection de Zn(II) par l'effet paraCEST (Chemical Exchange Saturation Transfert) [7,8].

2. Synthèse et études du ligand L4

2.1. Synthèse du ligand L4

2.1.1. 1^{ère} stratégie de synthèse

Nous avons d'abord choisi de suivre le schéma de rétrosynthèse présenté sur le **schéma III.1.**, à savoir partir des deux entités : (1) complexant du Gd(III) et (2) linker lié au complexant du Zn(II). Cette voie présente l'avantage de permettre le développement d'une série de ligands présentant des chélatants de Gd(III) différents.

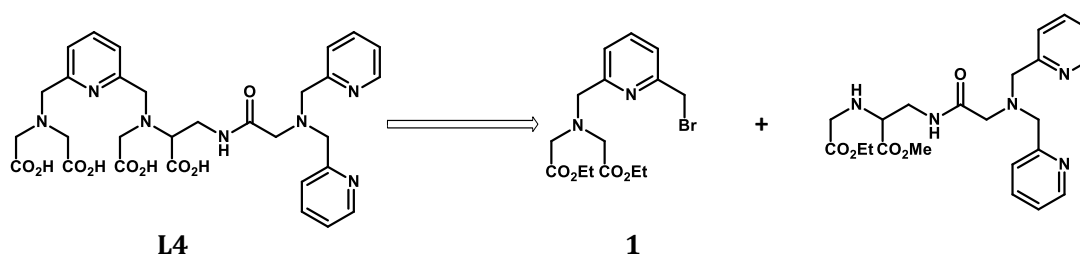


Schéma III. 1 : Rétrosynthèse du ligand **L4** par substitution nucléophile du chélatant de Zn(II) sur le composé **1**

Dans cette voie nous avons choisi de travailler sur la serine commerciale (**Schéma III. 2**). L'estérification de l'acide carboxylique de la serine commerciale en présence du chlorure de thionyle et d'éthanol a conduit à la formation du composé **19** avec un rendement de 98 %. La réaction du Boc₂O avec le composé **19** a conduit à la formation de l'amine protégé **20** avec un rendement de 65%. Ce dernier est alors engagé dans une réaction de bromation en présence de PPh₃ et de N-bromosuccinimide (NBS) [9]. Cette dernière est inspirée de la réaction de Wohl-Ziegler [10]. Le composé mono bromé **21** est alors obtenu avec un rendement 48 %.

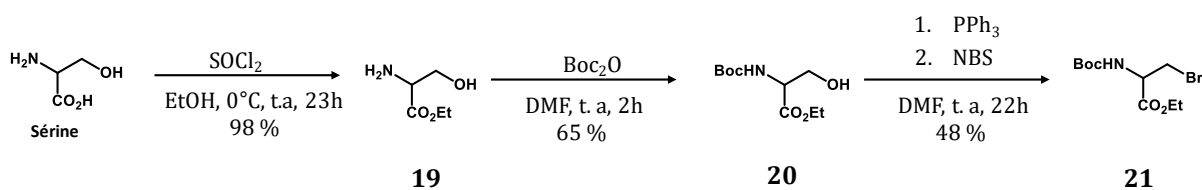


Schéma III. 2 : Synthèse du composé **21**

Dans le but de former l'azoture **22** (**Schéma III. 3**), le composé **21** a été engagé dans une réaction de substitution de nucléophile avec l'azoture de sodium. Au cours de cette réaction, la formation du composé **22** n'a pas été observée, seul l'alcène **22'** est obtenu avec 80 % de rendement. En effet, la réaction de substitution nucléophile est en compétition avec la réaction d'élimination. L'azoture, bien qu'étant une base modérée ($pK_a = 4,73$), déprotonne le composé **21** au cours d'une réaction d'élimination, favorisant ainsi la formation de l'alcène **22'** ainsi que l'acide azothydrique (HN_3). Pour minimiser cette réaction d'élimination, nous avons donc choisi de travailler à des températures plus basses.

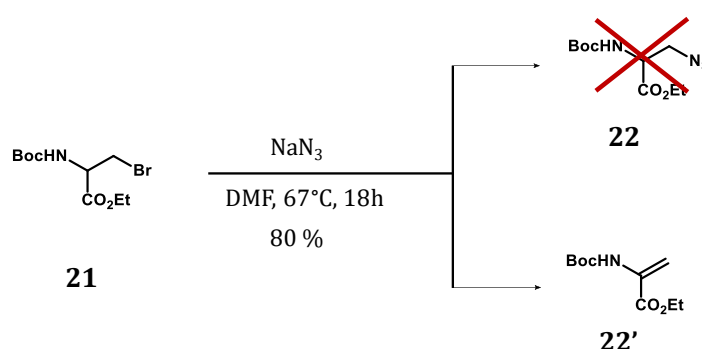


Schéma III. 3 : Synthèse du composé **22'**

Nous avons également choisi de remplacer le brome par un meilleur nucléofuge (un dérivé mésylé), et pour cela nous sommes repartis de la serine commerciale et avons suivi le schéma de synthèse présenté sur le **schéma III. 4**. Le dérivé mésylé **25** a été obtenu avec un rendement de 76 %. Dans le cadre de la formation de l'azoture **26**, plusieurs conditions de réaction ont été testées. Le **tableau III. 1** résume les résultats obtenus.

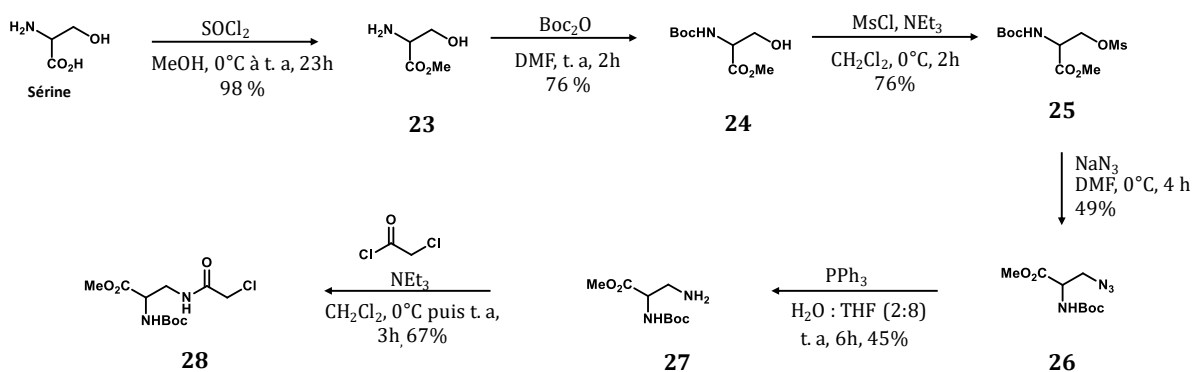


Schéma III. 4 : Synthèse du linker **28**

Dans un premier temps, la réaction de formation de l'azoture a été réalisée en abaissant la température de 35°C à 0°C. Ces résultats indiquent que le rendement de la réaction s'améliore avec la diminution de la température, et diminue avec l'augmentation du nombre d'équivalent de NaN₃ par rapport au composé **25**. Ceci confirme qu'augmenter la concentration de l'azoture, qui joue le rôle de base, favorise l'élimination par rapport à la substitution nucléophile.

Tableau III. 1 : Conditions testées pour la formation de l'azoture **26**

	neq du composé 25	neq de NaN ₃	Température °C	Rendement du produit 26
Condition 1	1	1	35	19
Condition 2	1	1	25	30
Condition 3	1	1	0	49
Condition 4	1	1,2	0	36
Condition 5	1	1,5	0	23

La réduction de l'azoture, par action de la triphénylphosphine en présence d'eau, a conduit à la formation de l'amine **27** avec un rendement de 45 %. L'amide **28** est alors formé avec un rendement de 67 % suite à la réaction avec le chlorure de chloroacétyle.

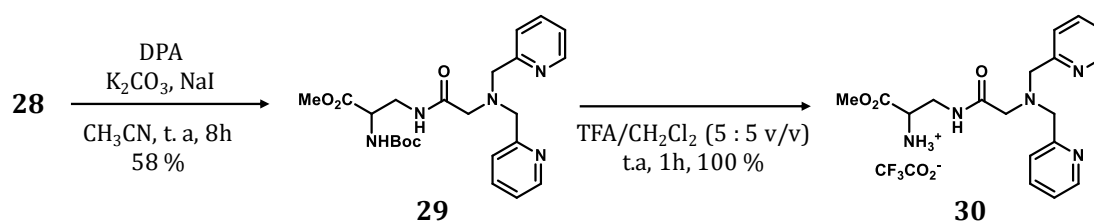


Schéma III. 5 : Synthèse de la partie chélatante de Zn(II) comportant de linker

Après l'ajout de la DPA sur le composé **28** (Schéma III. 5), l'intermédiaire **29** a été obtenu avec un rendement de 58 %. La déprotection de l'amine a conduit à l'obtention du composé **30** avec un rendement de 100 %.

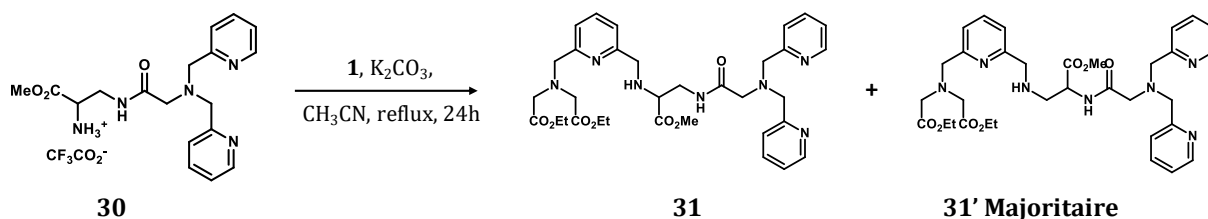


Schéma III. 6 : Couplage entre les intermédiaires 1 et 30

L'alkylation de l'amine **30** par l'intermédiaire **1** en présence de carbonate de potassium devrait conduire à la formation du composé **31** (**Schéma III. 6**). Cependant, le composé **31'** (résultat d'une transamidation) est obtenu majoritairement. Une analyse RMN 1D et 2D complète (**Figure III. 2**) a été nécessaire pour déterminer la structure de **31'**. En effet, **31** et **31'** ont la même masse moléculaire comme cela a été confirmé par spectrométrie de masse haute résolution sur les deux fractions de composés (minoritaires et majoritaires).

Les analyses RMN de ces deux composés montrent que les protons 2 et 3 n'ont pas le même environnement chimique. En effet, sur les spectres ^1H des composés **31** et **31'**, le signal issu du proton amide H_1 est facilement identifié aux déplacements chimiques respectif de 8.82 et 9.07 ppm. Dans le premier cas, il apparaît sous la forme d'un triplet, ce qui implique qu'il couple à deux protons. Ceci est confirmé dans l'analyse COSY où on observe le couplage entre le proton amide H_1 et les protons H_2 , qui apparaissent sous la forme d'un doublet de multiplets (3.57 et 3.73 ppm). De plus le couplage entre ces protons H_2 et le proton H_3 est également observé, confirmant ainsi l'enchaînement de la structure **31**. Dans le second cas, le proton amide apparaît sous la forme d'un doublet. En COSY, on observe bien le couplage entre ce proton et le proton H_3 . On note aussi que le couplage entre ce proton H_3 et les protons H_2 , confirmant la structure du composé **31'**, à savoir que le CH se situe entre le NH de l'amide et le CH_2 .

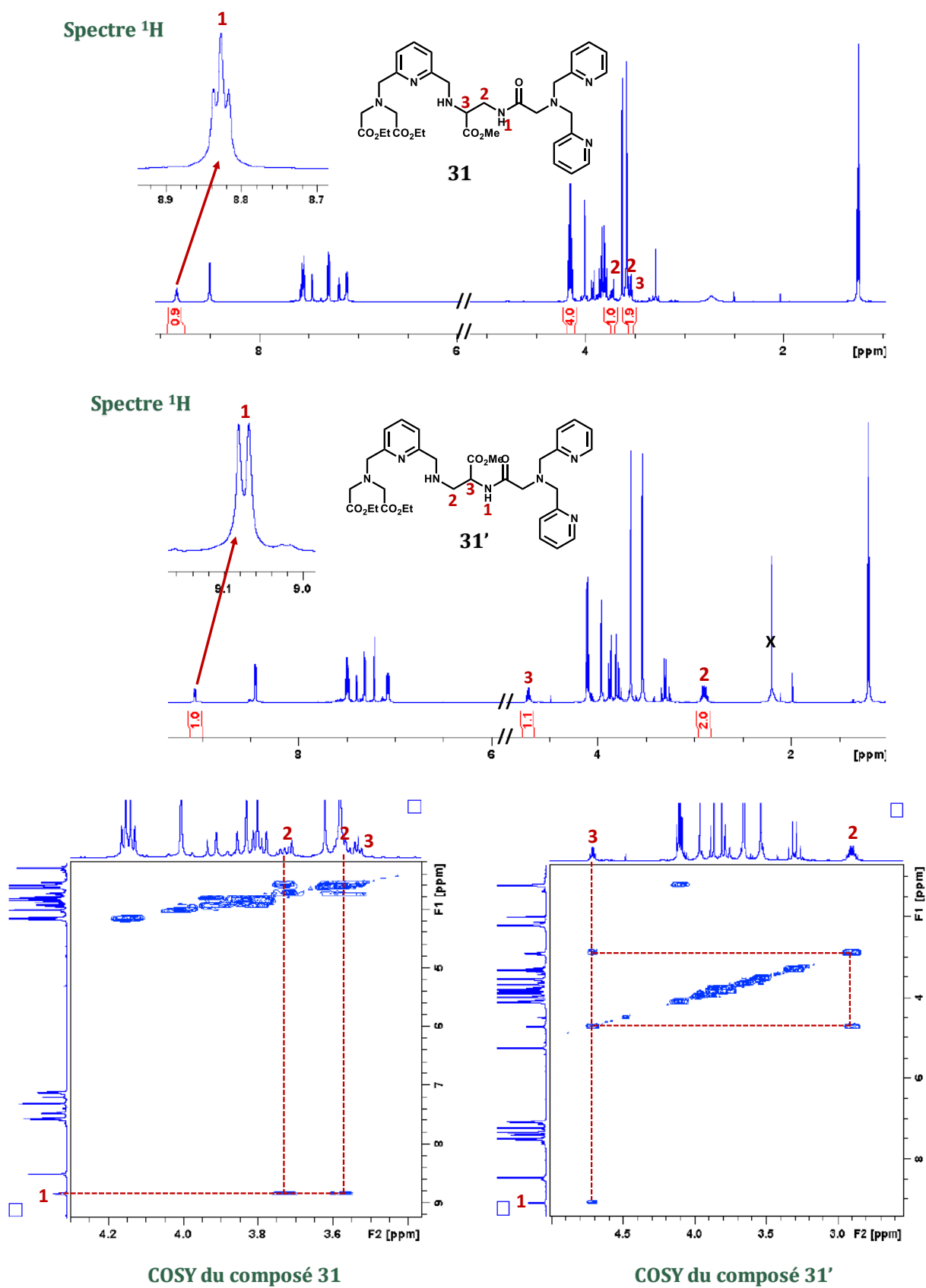


Figure III. 2 : Analyse des spectres ^1H et COSY des composés **31 et **31'****

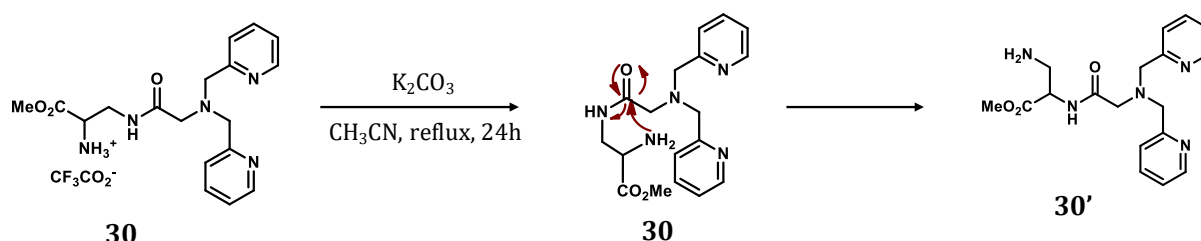


Figure III. 3 : Mécanisme de la transamidation en présence de K_2CO_3

Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que lors de la déprotection de l'amine **30** en présence du TFA, ce composé est obtenu en milieu acide sous la forme d'un ammonium. Ensuite, lors de la réaction d'alkylation entre **30** et **1** en milieu basique, l'ammonium **30** est déprotoné, libérant ainsi la forme réactive NH_2 , qui réagit alors de façon intra moléculaire avec le carbonyle de l'amide pour conduire à la formation du produit **30'** (**Figure III. 3**). Les deux composés **30** et **30'** coexistent en solution et sont susceptibles de réagir avec le composé **1**. Le réarrangement intramoléculaire s'effectue plus rapidement que la substitution nucléophile. C'est pourquoi le composé **31'** est obtenu majoritairement. Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature [11,12].

Devant ces difficultés, nous avons alors choisi de synthétiser séparément les parties complexantes de Gd(III) et Zn(II) comportant chacune une partie du linker.

2.1.2. 2^{ème} stratégie de synthèse

Le ligand **L4** peut être synthétisé en deux temps : premièrement, la synthèse du chélatant de Gd(III) comportant l'amine terminale et deuxièmement, une partie chélatante de Zn(II) comportant soit une fonction acide, soit un groupement chlorure d'acyle qui permettra le couplage entre les deux parties par formation d'une fonction amide (**Schéma III. 7**).

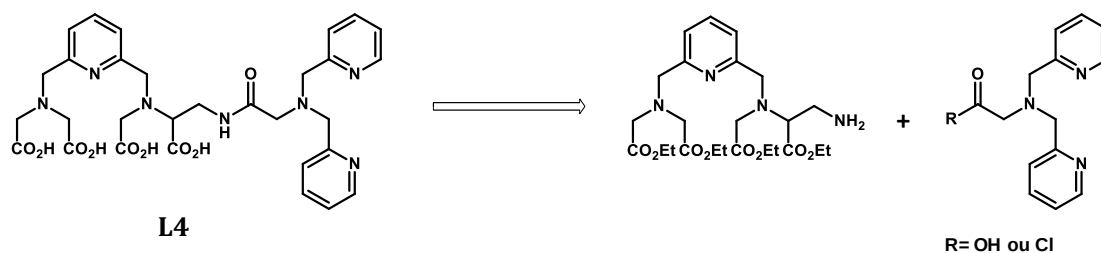


Schéma III. 7 : Rétrosynthèse du ligand **L4** par couplage du chélatant de Gd(III) avec celui de Zn(II)

La première étape consiste en la synthèse du chélatant de Gd(III). Le composé **19** synthétisé comme dans la voie précédente est engagé dans une réaction de substitution nucléophile statistique avec le composé **1** en présence de la DIEA (**Schéma III. 8**). Le composé **32** est ainsi obtenu avec un rendement de 74 %.

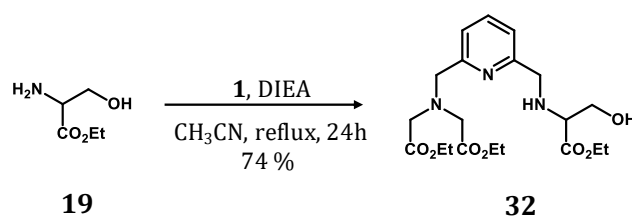


Schéma III. 8 : Synthèse de l'intermédiaire **32**

L'amine secondaire de **32** est alors engagée dans une réaction de substitution de nucléophile avec l'éthyle bromoacétate (**Schéma III. 9**). Lors de cette réaction, la formation de plusieurs produits a été observée. La complexité de la purification n'a pas permis d'isoler le produit **33** avec suffisamment de pureté. Grâce à la spectrométrie de masse, nous avons pu observer un pic d'un ion moléculaire à 466,20. La perte de 45 en masse moléculaire pourrait correspondre à la libération d'une molécule d'éthanol, qui serait la conséquence de la formation de la lactone **33'** par transestérification. Cette lactone, formant un cycle à 6 atomes, serait favorisée. Un pic caractéristique de l'ion moléculaire du composé **1** est également observé. Comme dans le chapitre 2, il serait possible de poursuivre la synthèse avec un mélange de **33** et **33'** puisqu'une ouverture du cycle lactone par hydrolyse basique est possible. Cependant, cela conduirait à l'hydrolyse de toutes les fonctions esters, ce qui n'est pas favorable pour la suite de la synthèse.



33

33

L4

[illegible]

152

L'action du (triméthylsilyl)diazométhane sur l'acide N_{α} -Boc- N_{β} -Z-L-2,3-diaminopropionique commercial en présence du méthanol a conduit à la formation de l'ester **34** avec un rendement de 100% (**Schéma III. 11**). L'amine **35** est ensuite obtenue après clivage quantitatif du carbamate en milieu acide.

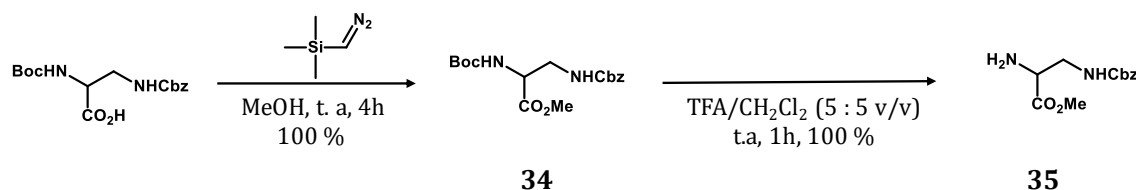


Schéma III. 11 : Synthèse du composé 35

Suite à une réaction de substitution nucléophile statistique de l'amine **35** avec du bromoacétate de *tert*-butyle en présence de carbonate de potassium, le composé **36** a été obtenu avec un rendement de 58% (**Schéma III. 12**). Il est ensuite engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec l'intermédiaire **1**. Cela a conduit à l'obtention du composé **37** avec un rendement de 72 %. Ainsi la partie complexante de Gd(III) a été obtenue.

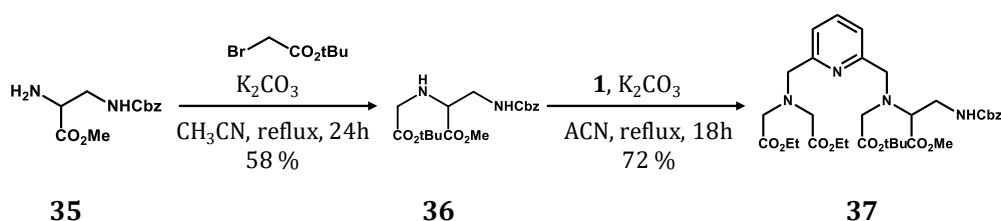


Schéma III. 12 : Synthèse de l'intermédiaire 37

Une hydrogénation catalytique du composé **37** a été réalisée afin de déprotéger la fonction amine (**Schéma III. 13**). Ainsi, le composé **38** a été obtenu avec un rendement de 83%. Aucune réaction de cyclisation n'a été observée au cours de cette étape puisque la fonction *tert*-butyl ester s'est révélée suffisamment stable.

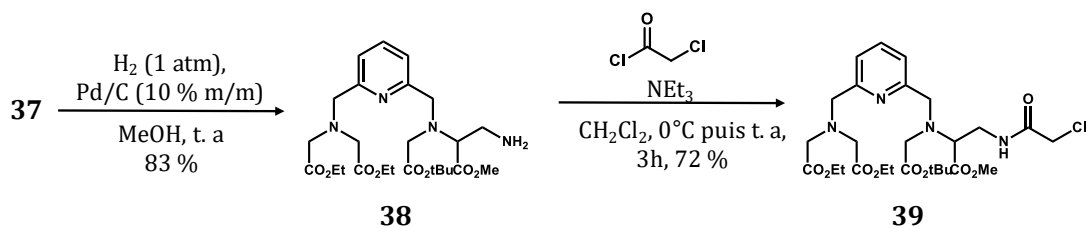


Schéma III. 13 : Synthèse de la partie chélatante de Gd(III) comportant le linker amide

L'amine produite réagit ensuite avec le chlorure de chloroacétyle pour former l'amide **39** qui est ensuite engagée dans une réaction de substitution de nucléophile avec la DPA (Schéma III. 14). Ainsi, le précurseur **40** est obtenu avec un rendement de 69 %.

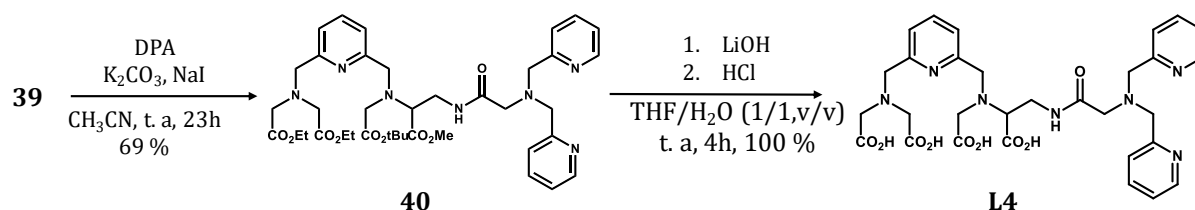


Schéma III. 14 : Synthèse du ligand **L4**

Les esters éthyliques sont d'abord hydrolysés en milieu basique en présence d'hydroxyde de lithium puis dans un second temps, le milieu est acidifié pour hydrolyser l'ester de *tert*-butyle. Le ligand **L4** est alors obtenu avec un rendement de 100 % après une purification sur une phase inverse. Un rendement global de 15 % est obtenu après 9 étapes (moyenne de 81 % de rendement par étape).

2.2. Etude de la réponse de GdL4 au Zn(II)

2.2.1. Etude de la stoechiométrie des complexes **LnL4**

Nous avons dans un premier temps étudié la stoechiométrie des complexes **LnL4** par suivi de l'intensité de luminescence du complexe **EuL4** en fonction de la concentration en Eu(III) dans l'HEPES 0,1M à 298 K (pH = 7,4) (**Figure III. 4**).

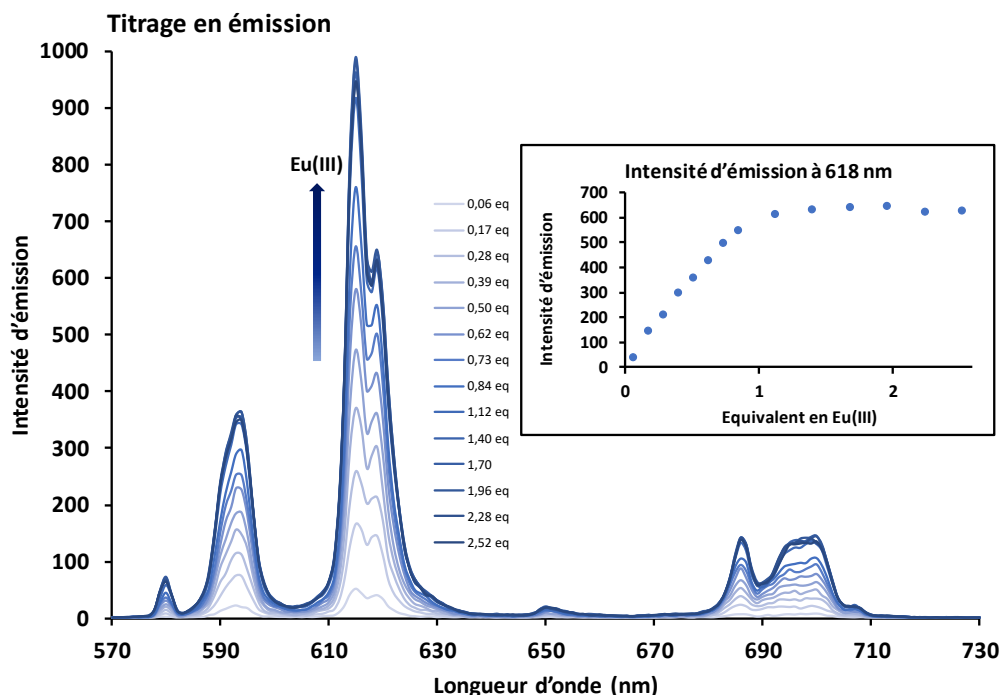


Figure III. 4 : Evolution du spectre d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 268 \text{ nm}$) du complexe **EuL4** par ajout d'une solution d'**Eu(III)** à $[\text{L4}] = 175 \mu\text{M}$ dans l'HEPES 0,1M à 298 K (pH = 7,4). Encadré : variation de l'intensité d'émission mesurée à 618 nm (transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$) en fonction du nombre d'équivalent d'**Eu(III)** ajouté en solution.

Le spectre obtenu est typique d'un complexe d'**Eu(III)**. L'intensité de la bande d'émission de l'**Eu(III)** correspondant à la transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ augmente linéairement avec la concentration en **Eu(III)** jusqu'à 1 équivalent. Au-delà de cette concentration, l'intensité de luminescence reste constante, signifiant qu'un complexe **Eu/L4** de stoechiométrie 1/1 est bien formé.

2.2.2. Détection du **Zn(II)** par relaxométrie

Nous avons étudié l'influence du **Zn(II)** sur la relaxivité du complexe **GdL4** par relaxométrie à 20 MHz et 25°C. Les résultats sont présentés dans la **figure III. 5**.

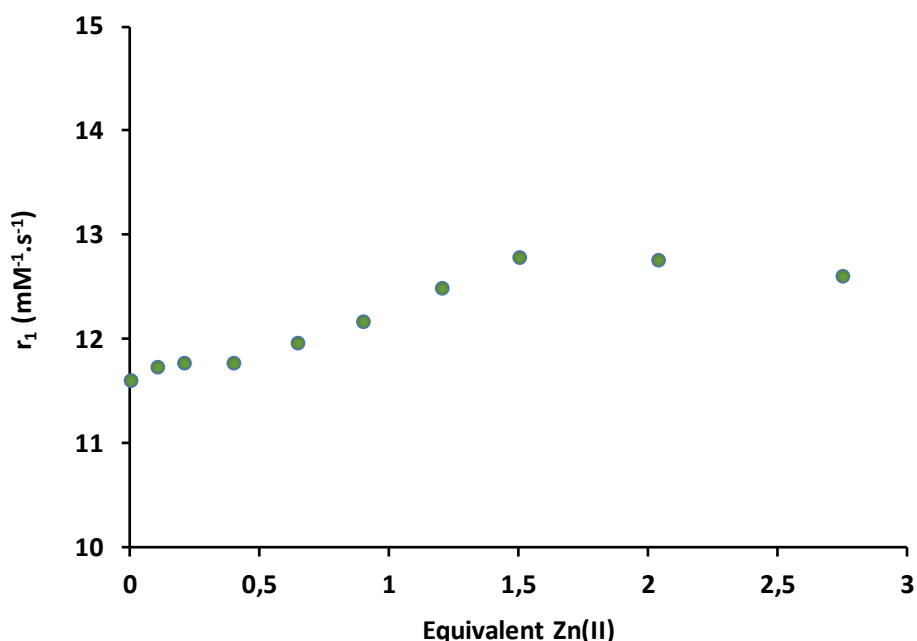


Figure III. 5 : Relaxivité du complexe **GdL4** à 0,5 mM dans l'HEPES 0,1 M (pH = 7,4) en fonction du nombre d'équivalents en Zn(II) à 20 MHz et 298 K.

La relaxivité semble varier en trois temps, une première phase jusqu'à 0.5 équivalent de Zn(II) ajouté (relaxivité quasi constante), puis une deuxième phase avec une augmentation de la relaxivité jusqu'à 1 équivalent de Zn(II) ajouté (1.5 équivalent au total), et enfin une relaxivité constante au-delà. L'augmentation de relaxivité totale n'excède pas 9 %, ce qui reste faible pour une détection du Zn(II) en pratique. La relaxivité élevée en absence de Zn(II) plaide en faveur de la présence de deux molécules d'eau coordonnées et donc pas de coordination de la fonction amide pour compléter la sphère de coordination du Gd(III). Cette faible augmentation de relaxivité pourrait être expliquée par une faible augmentation de q (voir chapitre 4), ce qui pourra être confirmé par des mesures de temps de vie de luminescence sur le complexe Eu(III) correspondant et par des mesures de RMN ¹⁷O pour obtenir un q moyen en absence et en présence de Zn(II).

Ce complexe **GdL4** n'est donc pas très adapté pour la détection du Zn(II) par relaxométrie en raison de sa faible réponse. La présence de la fonction amide et donc d'un proton échangeable à proximité d'un potentiel Ln(III) paramagnétique nous a poussé à regarder les propriétés paraCEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) de

ce composé où le Gd(III) est remplacé par un autre Ln(III) paramagnétique. Pour cela, nous nous sommes intéressés au complexe **YbL4** et nous avons enregistré un spectre CEST en absence et en présence de Zn(II). Aucun effet CEST n'est observé. Ceci est à priori étonnant vu la proximité du proton amide échangeable et du site paramagnétique, mais encore plus qu'en relaxométrie la prédiction des effets CEST reste très complexe [13] et il a déjà été montré que de petits changements structuraux peuvent conduire à la disparition d'un effet CEST [14].

Etant donné que la structure de **L4** est proche de celle de **L2**, nous avons décidé d'étudier la réponse relaxométrique au Zn(II) de **GdL4** en présence de HSA. **L4** diffère de **L2** par la partie complexante du Zn(II) qui est uniquement de la DPA (sans les fonctions carboxylates) et par le linker qui possède une fonction amide. Afin de pouvoir faire une comparaison plus précise des facteurs influençant l'affinité de nos complexes pour la HSA ainsi que la réponse au Zn(II) en présence de HSA, nous avons décidé de synthétiser le ligand intermédiaire **L5** (**Figure III. 6**), qui possède la même unité complexante pour Zn(II) que **L4** et le même linker que **L2**.

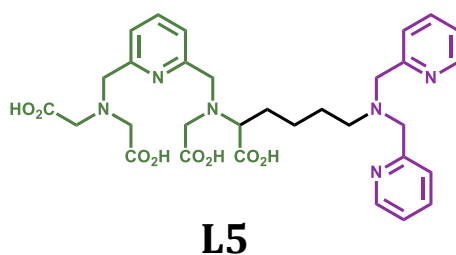


Figure III. 6 : Structure du ligand L5

3. Synthèse de L5

La synthèse du ligand **L5** est similaire à celle du ligand **L2** du chapitre 2 puisque seul le motif DPA est modifié. L'intermédiaire **41** est obtenu avec un rendement de 83 % après une réaction de dialkylation de l'amine **13** par le 2-(chlorométhyl)pyridine chlorhydrate commercial en présence de la DIEA. Cet intermédiaire est alors soumis à une hydrolyse basique en présence d'hydroxyde de lithium pour former quantitativement le ligand **L5** (**Schéma III. 15**). Ce ligand a été obtenu avec un bon rendement global de 44 % après 6 étapes.

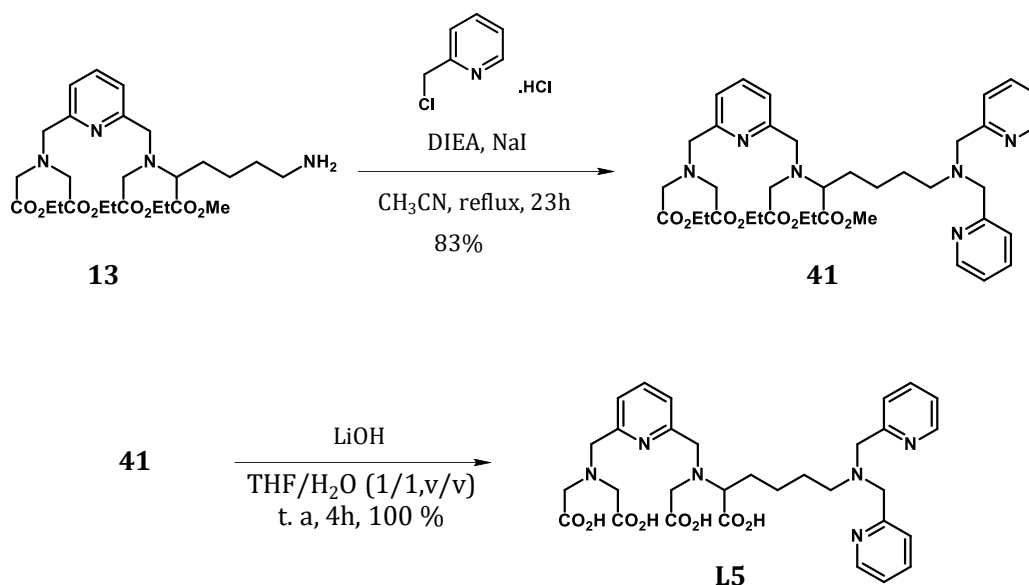


Schéma III. 15 : Synthèse du ligand L5

4. Optimisation de la réponse aux cations métalliques en présence de HSA

4.1. Etude de l'affinité des complexes pour la HSA

Il a été précisé précédemment que la HSA possède plusieurs sites capables d'interagir avec les agents de contraste. Pour étudier le comportement de nos complexes de Gd(III) en absence et en présence de Zn(II), nous avons effectué des titrages E avec les complexes formés avec L4 et L5. Dans ce cadre, la concentration en complexe reste constante et seule la concentration en HSA varie. Nous avons ajusté les données en excès de HSA par rapport au complexe afin de déterminer l'affinité du site de plus forte affinité. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure III. 8**.

Ces résultats montrent une détection de Zn(II) et de Cu(II) à concentration physiologique de HSA (0.6 mM) pour les deux systèmes. Cependant, cette réponse est plus accentuée dans le cas du ligand **L5** par rapport à **L4**. En effet, dans le cas du complexe **GdL4**, une variation de $1/T_{1\text{para}}$ de 7 % est obtenue en présence de Zn(II) et plus de 20 % en présence de Cu(II) à 0,6 mM de HSA ; alors que pour **GdL5** une augmentation d'environ 40 % est observée en présence de Zn(II) et 70 % en présence de Cu(II) à 0,6 mM de HSA. Pour rappel, pour **GdL2**, nous avons des variations de 25 % pour Zn(II) et 86 % pour Cu(II).

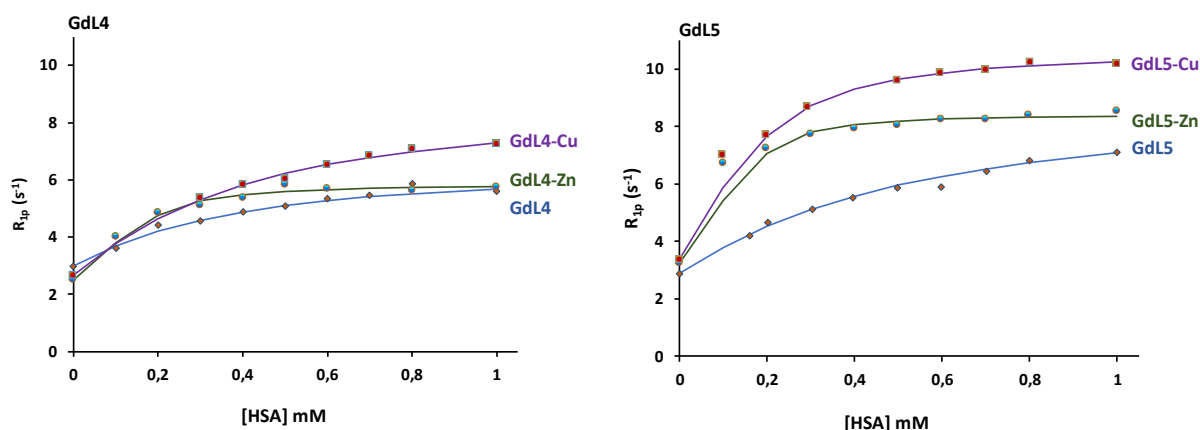


Figure III. 8 : Titrage E : Augmentation paramagnétique du taux de relaxation en fonction de la concentration en HSA et à **[GdL4, GdL4-Zn et GdL4-Cu]** constante = 0,22 mM, et **[GdL5, GdL5-Zn et GdL5-Cu]** constante = 0,21 mM à 310 K et à 20 MHz, dans l'HEPES (0,1 M, pH 7,4). Les traits représentent les fits suivant l'équation II. 2. Détermination du site de plus forte affinité (fit en excès de HSA).

Au vu de ces résultats, le système **GdL5** semble être celui qui répond le mieux au Zn(II), tandis que **GdL4** semble être très sélectif pour le Cu(II).

Afin de rationaliser les différences observées, nous avons décidé de déterminer l'affinité de ces complexes pour la HSA.

$$R_1^{pobs} = 10^3 \times \left\{ \begin{array}{l} (r_1^f \cdot c_1) + \frac{1}{2}(r_1^b - r_1^f) \times \\ (c_{HSA} + c_1 + K_A^{-1} - \sqrt{(c_{HSA} + c_1 + K_A^{-1})^2 - 4 \cdot c_{HSA} \cdot c_1}) \end{array} \right. \quad \text{III. 1}$$

où r_1^f et r_1^b représentent la relaxivité du complexe dans l'état libre et lié respectivement ; c_1 et c_{HSA} les concentrations de complexe et HSA respectivement et $K_A = 1/K_d$ la constante d'affinité.

Dans ce cadre, l'équation III. 1 a été utilisée pour déterminer l'affinité du site de plus forte affinité en faisant un fit en présence d'un excès de HSA par rapport aux complexes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III. 2, ainsi que les affinités de **GdL2** et **GdL2-Zn** pour comparaison.

Tout d'abord, en absence de cation divalent, les K_d sont de 100 μM ou moins, en présence de cations (à l'exception de **GdL4Cu**), les affinités sont beaucoup plus fortes et les K_d tombent dans la gamme de 20 à 60 μM .

En absence de cation divalent, **GdL2** a la plus forte affinité ce qui s'explique sans doute par la plus forte charge négative du complexe, en raison de la présence des deux fonctions carboxylates sur la DPA. Comme indiqué précédemment, les poches de complexation de la HSA sont entourées d'une charge positive favorisant les interactions avec les complexes négatifs.

Tableau III. 2 : Constantes de dissociation ($K_d = K_a^{-1}$), relaxivités dans l'état libre (r_1^f) et dans l'état lié (r_1^b) obtenues pour le site de plus forte affinité (fit en excès de HSA) et charge globale des complexes.

	r_1^f	r_1^b	$K_d \mu\text{M}$	Charge du complexe
GdL2	10,21	19,5(3)	100(20)	-2
GdL4	13,69	29(1)	220(40)	0
GdL5	13,59	41(2)	350(50)	0
GdL2Zn	10,58	23,5(5)	50(15)	-1
GdL4Zn	11,55	28(1)	30(10)	+1
GdL5Zn	15,43	40,5(5)	20(5)	+1
GdL4Cu	12,28	41(2)	270(50)	+1
GdL5Cu	16,04	51,0(5)	60(5)	+1
Gd18Zn^a			40	+5

a) Gd18 est le complexe GdDOTA-diBPEN développé par Sherry *et al.*[5]

Cette hypothèse se confirme encore lorsque l'on compare l'affinité de **GdL2** et **GdL1** pour la HSA. **GdL1** ($K_d = 170 \mu\text{M}$) qui est neutre à une affinité environ deux fois moins forte pour la HSA que **GdL2**. Enfin, si l'on compare les affinités de **GdL4** et **GdL5**, la seule différence provient du linker, et on peut imaginer des interactions secondaires de type liaisons hydrogène entre la fonction amide de **GdL4** et la HSA.

Les K_d de tous ces complexes en présence de Zn(II) sont comparables et se situent dans la gamme 20-50 μM , ce qui est en accord avec la valeur de 40 μM mesurée par Sherry pour son système **Gd18Zn** [5]. Les affinités pour la HSA sont dans l'ordre suivant : **GdL5Zn** > **GdL4Zn** > **GdL2Zn**. Au vu des charges des complexes, cet ordre d'affinité ne peut s'expliquer par des phénomènes électrostatiques. Comme cela a déjà été évoqué et a déjà été proposé dans la littérature [15], une coordination directe du Zn(II) par la HSA doit sans doute être prise en compte. Or **GdL2** possède plus de fonctions coordinantes pour le Zn(II) que **GdL4** ou **GdL5**, ce qui laisse peu de place pour les groupes coordinants de la HSA, expliquant son affinité plus faible pour la HSA.

En ce qui concerne le Cu(II), l'affinité de **GdL5Cu** est du même ordre de grandeur que les affinités des complexes avec le Zn(II), par contre l'affinité de **GdL4Cu** pour la HSA est très faible, du même ordre de grandeur que sans cation divalent. Ce résultat est très inattendu et ne peut être expliqué sur de simples considérations électrostatiques ou d'interaction directe du cation avec la HSA car le site de complexation du Cu(II) est le même dans les deux molécules. Il est toutefois possible d'envisager une coordination du Cu(II) par l'amide déprotonnée comme cela a déjà été observé dans la littérature [16]. La coordination directe du Cu(II) par la HSA serait ainsi défavorisée. Cette hypothèse expliquerait la différence de comportement entre le Zn(II) et le Cu(II) puisqu'il a récemment été montré que le Zn(II) pouvait être coordonné par des amides déprotonnées mais seulement en milieu basique (pH proche de 9), pas à pH physiologique au contraire du Cu(II) [17]. Des études potentiométriques pourront être envisagées pour vérifier ce point. On ne peut pas non plus exclure que le site d'interaction soit différent. Pour confirmer/infirmier cette hypothèse, nous devons faire des réactions de compétition avec des ligands connus des différents sites d'interaction (warfarin, ibuprofène Figure III. 7), et nous envisageons également des mesures STD (Saturation Transfer Difference) par RMN.

4.2. Etude des Profils NMRD

Pour élucider les comportements de ces systèmes, des profils NMRD des complexes de Gd(III) ont été enregistrés sans et avec Zn(II) ou Cu(II) à haut champ entre 20 et 400 MHz. Les résultats sont présentés dans la **figure III. 9**.

Ces profils montrent tous une bosse aux champs intermédiaires, caractéristique des molécules à rotation lente, démontrant ainsi la présence d'interaction de nos complexes avec la HSA en présence et en absence de Zn(II) et de Cu(II). Ces résultats confirment également une réponse significative au Zn(II) et au Cu(II) en présence de la HSA aux champs intermédiaires (typiquement 20-40 MHz). Dans le cas du complexe **GdL4**, une augmentation de la relaxivité d'environ 7 % est obtenue et environ 30 % pour **GdL5** par l'ajout de Zn(II) en présence de HSA à 20 MHz à 37° C. Quant à la détection de Cu(II), le complexe **GdL4** présente une augmentation de la relaxivité de plus de 20 % tandis qu'une augmentation d'environ 60 % est obtenue pour le complexe **GdL5** en présence de HSA à 20 MHz à 37°C. Ces résultats sont en bon accord avec ce qui a été observé précédemment.

Un ajustement des profils de nos systèmes en présence de la HSA par la théorie SBM en intégrant l'approche Lipari-Szabo a été effectué. En effet, comme nous l'avons vu tous les systèmes sont en interaction avec la HSA et nécessitent donc l'intégration de cette approche. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure III. 9**, ainsi que dans le **tableau III. 3** et les équations sont données en **annexe 6**.

La signification des différents paramètres est donnée dans le chapitre 2. La valeur de q a été fixée à 2 pour tous les complexes. Les paramètres électroniques ne doivent pas être surinterprétés car leur description dans l'approche SBM reste questionnable [18]. Les ajustements ont été effectués à partir de 20 MHz pour **GdL4** et **GdL5** et à partir de 4.8 MHz pour **GdL2**, champs pour lesquels ces paramètres électroniques ont moins d'influence, ce qui nous permet d'obtenir des informations fiables sur les processus dynamiques.

Au vu des constantes d'affinité et des conditions de travail (HSA en excès par rapport au complexe), la fraction de complexe liée à la HSA est très proche de 100 % même pour les complexes les moins affins. Nous pouvons donc en déduire que nous regardons une espèce unique en solution, qui est le complexe lié à la HSA.

D'après le **tableau III. 3**, les valeurs de τ_1 et τ_g restent globalement du même ordre de grandeur quelles que soient les complexes (autour de 3000 ps pour τ_g et 200 ps pour τ_1). Le fait que les valeurs de τ_g varient peu est logique, puisque ce temps de corrélation

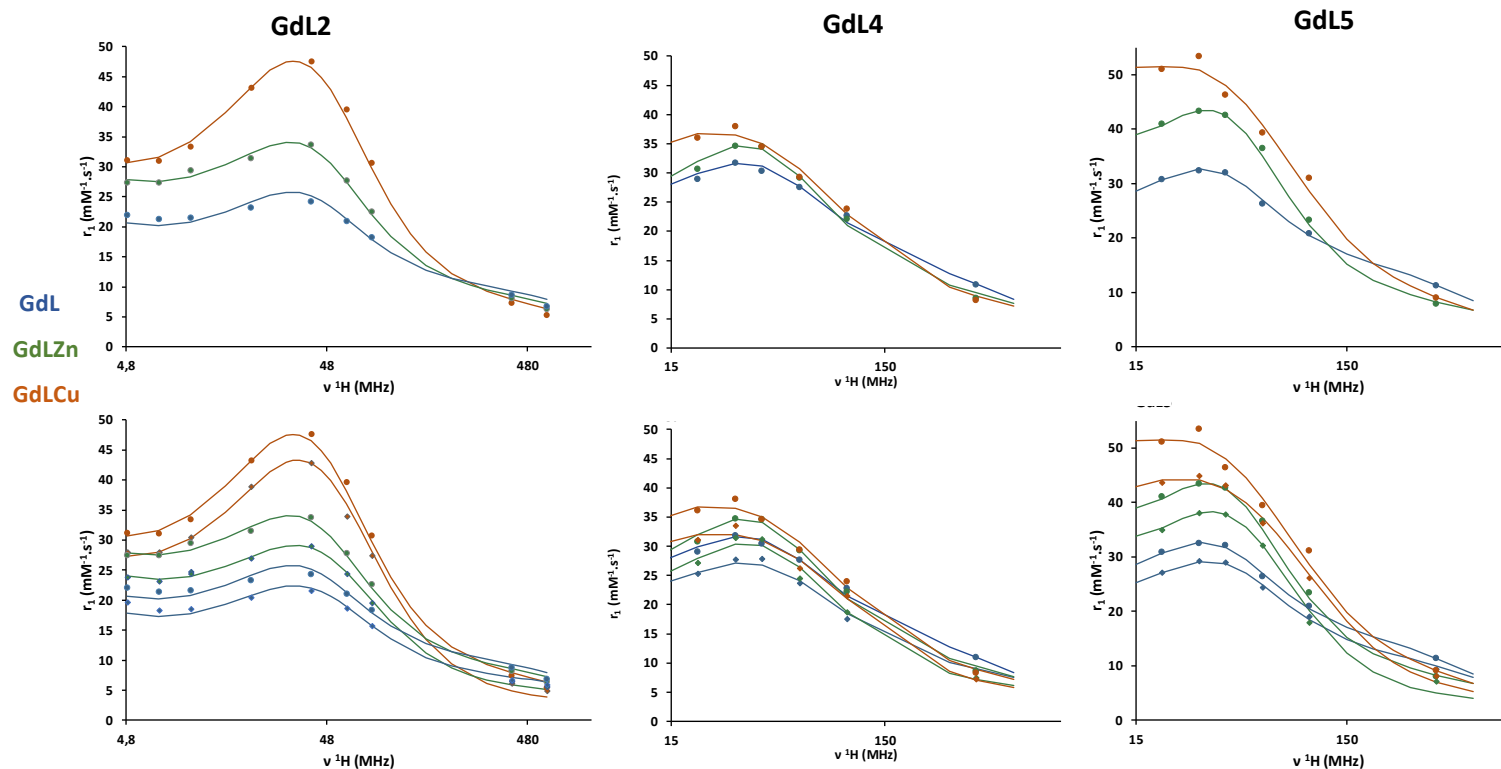


Figure III. 9 : Profil ^1H NMRD des complexes $[\text{GdL2}] = 0,362 \text{ mM}$, $[\text{GdL4}] = 0,218 \text{ mM}$, $[\text{GdL5}] = 0,211 \text{ mM}$ (à 298 K $\bullet$ et 310 K $\blacklozenge$), $[\text{GdL2-Zn}] = 0,362 \text{ mM}$, $[\text{GdL4-Zn}] = 0,216 \text{ mM}$, $[\text{GdL5-Zn}] = 0,210 \text{ mM}$ (à 298 K $\bullet$ et 310 K $\blacklozenge$) et $[\text{GdL2-Cu}] = 0,362 \text{ mM}$, $[\text{GdL4-Cu}] = 0,216 \text{ mM}$, $[\text{GdL5-Cu}] = 0,210 \text{ mM}$ (à 298 K $\bullet$ et 310 K $\blacklozenge$) en présence de HSA ($0,6 \text{ mM}$). Les traits représentent les fits obtenus avec la théorie SBM et intégrant l'approche Lipari-Szabo.

correspond grossièrement au temps de corrélation rotationnel de la HSA. On peut noter toutefois que les valeurs de τ_g pour **GdL4Cu** et **GdL5Cu** sont légèrement inférieures aux autres (environ 2000 ps). D'autre part, le fait que les temps de corrélation rotationnel locaux restent du même ordre de grandeur indique qu'il y a assez peu de changement au niveau des mouvements locaux du Gd(III). Ils sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés pour les complexes seuls (voir chapitre 2 : $\tau_R(\mathbf{GdL1}) = 196$ ps et $\tau_R(\mathbf{GdL2}) = 185$ ps), ainsi que ceux de complexes ayant une structure similaire.

Cela signifie que la partie complexante du Gd(III) a assez peu d'interactions avec la HSA, ce qui était attendu vu la longueur du linker. On peut noter toutefois qu'en présence de HSA **GdL2** a un temps de corrélation rotationnel local significativement plus faible que ceux de **GdL4** ou **GdL5**.

Le paramètre qui est le plus impacté par la présence des cations divalents est le paramètre d'ordre S^2 . En effet, nous pouvons remarquer que la rigidité augmente dans l'ordre suivant quel que soit la structure du complexe : **GdL** < **GdLZn** < **GdLCu**. La présence d'un cation divalent permet donc de rigidifier le système et le Cu(II) forme des entités toujours plus rigide que le Zn(II). En absence de cation, la rigidité est de l'ordre de 0.17, en présence de Zn(II) de 0.25 et en présence de Cu(II) de 0.42.

On peut remarquer deux exceptions à cela : **GdL5Zn** qui possède un S^2 de 0.36, donc beaucoup plus élevé que les autres et **GdL4Cu** qui possède un S^2 de 0.32, donc plus faible que les autres.

Concernant la détection du Zn(II) en présence de HSA, la combinaison d'une unité de reconnaissance sans fonction carboxylate et d'une chaîne alkyle hydrophobe présente les meilleures propriétés pour obtenir un système plus rigide.

La rigidité beaucoup plus faible qu'attendue du système **GdL4Cu** lié à la HSA doit être due à la présence de la fonction amide. Comme évoqué précédemment, une explication serait la coordination de l'amide déprotonnée au Cu(II) à pH physiologique. Cette coordination ne serait pas observée à pH physiologique avec le Zn(II) et pourrait expliquer la différence de comportement du système **GdL4** pour le Cu(II) et le Zn(II). Le Cu(II) serait ainsi moins exposé à la HSA et la coordination directe du Cu(II) par la HSA

serait diminuée voire inexistante. Nous ne pouvons pas non plus exclure que ce complexe interagisse avec un site différent des autres. Des expériences complémentaires seront donc nécessaires pour élucider sans ambiguïté ce comportement singulier. Ceci est d'autant plus important que **GdL4** est très sélectif pour le Cu(II) par rapport au Zn(II), ce qui est très difficile à obtenir de manière générale.

Tableau II. 3 : Valeurs des paramètres après fit avec l'approche Lipari-Szabo

	GdL2			GdL4			GdL5		
	Seul	Zn(II)	Cu(II)	Seul	Zn(II)	Cu(II)	Seul	Zn(II)	Cu(II)
$\Delta H^\ddagger$ (kJ.mol ⁻¹) ^a	50	50	50	50	50	50	50	50	50
k_{ex} (10 ⁶ s ⁻¹) à 298 K ^a	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3
E_g (kJ.mol ⁻¹)	12	15	12(5)	10(5)	10(5)	11(4)	13(5)	13(4)	14(3)
τ_g (ps) à 298 K	3000(300)	3200(400)	3100(200)	2500(300)	2600(300)	1900(200)	3500(400)	3200(300)	2200(300)
E_l (kJ.mol ⁻¹)	24(5)	36(13)	55(10)	30(5)	37(8)	30(5)	17(4)	55(9)	46(9)
τ_l (ps) à 298 K	143(7)	160(15)	200(30)	260(30)	200(30)	170(40)	280(30)	175(25)	230(30)
E_{GdH} (kJ.mol ⁻¹)	25(14)	40(15)	40(15)	10(5)	10(5)	20(10)	36(10)	55(20)	32(10)
E_v (kJ.mol ⁻¹) ^b	1	1	1	1	1	1	1	1	1
τ_v (ps)	8.2(0.9)	8(1)	11(1)	16.1(5)	17.6(8)	21.4(9)	10(1)	7.4(8)	21(1)
Δ^2	0.068(7)	0.064(1)	0.075(8)	0.071(5)	0.083(5)	0.028(5)	0.073(5)	0.068(6)	0.026(5)
S^2	0.16(1)	0.24(1)	0.41(2)	0.19(3)	0.26(3)	0.32(4)	0.17(1)	0.36(2)	0.45(3)

a. Fixé à la valeur de GdPy [19]

5. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, le ligand **L4** avait initialement été synthétisé dans le but d'obtenir une variation de relaxivité par changement de q pour la détection du Zn(II). La synthèse de ce ligand s'est révélée plus délicate que prévu car des réactions parasites de transamidation et de lactonisation ont été observées. De plus, la détection directe du Zn(II) par le complexe **GdL4** s'est soldée par un échec malgré les prévisions des calculs DFT. Des études sont en cours afin de comprendre les raisons de ces mauvaises prédictions. Afin de valoriser les efforts de synthèse, nous nous sommes donc tournés vers une étude structurale de la réponse au Zn(II) et au Cu(II) en présence de HSA. Pour cela, nous avons synthétisé le ligand **L5**, intermédiaire entre **L2** et **L4** puisqu'il possède le même linker que **L4** et la même unité complexante des cations divalents que **L4**.

Nous avons pu montrer qu'avec ces trois molécules présentant un site de complexation au Gd(III) similaire, il était possible de détecter à la fois le Zn(II) et le Cu(II) en présence de HSA, ainsi que de modifier les pourcentages de réponse et les sélectivités en fonction des changements structuraux. Quelques conclusions peuvent être tirées :

- Tous les complexes présentent une meilleure réponse au Cu(II) qu'au Zn(II) en présence de HSA, ce qui est classique.
- De façon générale, l'introduction d'un cation divalent augmente l'affinité du complexe pour la HSA
- Le complexe **GdL5** présente la meilleure réponse au Zn(II)
- Le complexe **GdL2** présente la meilleure réponse au Cu(II)
- Le complexe **GdL4** présente la meilleure sélectivité pour le Cu(II) vs Zn(II)

D'après ces conclusions, nous pouvons en déduire que la réponse au Zn(II) est optimale avec un linker hydrophobe et une partie complexante du Zn(II) plus hydrophobe également (sans fonction carboxylate). Il serait alors intéressant afin d'optimiser cette réponse de synthétiser des complexes avec des linkers de longueurs différentes afin de voir si une longueur optimale s'adaptant à la poche de complexation hydrophobe de la HSA existe. Au vu des conclusions du chapitre précédent, il serait également intéressant de développer un système similaire à **L5** comportant une double partie complexante

pour le Zn(II), ce qui devrait permettre d'augmenter la rigidité du système et donc la réponse au Zn(II).

La présence des fonctions carboxylates sur la partie DPA modifiée augmente la réponse au Cu(II) en présence de HSA comme en témoigne la réponse de **GdL2**.

Enfin, le complexe **GdL4** présente un très grand intérêt pour la détection du Cu(II) car il ne répond que très peu au Zn(II). Au vu de ces résultats, il semblerait judicieux de combiner le linker de **L4** avec l'unité complexante de **L2** dans le futur, afin d'exalter la réponse au Cu(II) tout en conservant une très bonne sélectivité par rapport au Zn(II). Il sera toutefois nécessaire de confirmer l'origine de la réponse unique de GdL4 au Cu(II). Si la déprotonation de la fonction amide en présence de Cu(II) à pH physiologique s'avère être exacte, il serait également intéressant de modifier la position de l'amide dans le linker pour en optimiser la position et/ou l'orientation.

6. Bibliographie

1. Major, J.L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T.J. The synthesis and in vitro testing of a zinc-activated MRI contrast agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 13881–13886, doi:10.1073/pnas.0706247104.
2. Matosziuk, L.M.; Leibowitz, J.H.; Heffern, M.C.; MacRenaris, K.W.; Ratner, M.A.; Meade, T.J. Structural Optimization of Zn(II)-Activated Magnetic Resonance Imaging Probes. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12250–12261, doi:10.1021/ic400681j.
3. Yu, J.; Martins, A.F.; Preihs, C.; Clavijo Jordan, V.; Chirayil, S.; Zhao, P.; Wu, Y.; Nasr, K.; Kiefer, G.E.; Sherry, A.D. Amplifying the Sensitivity of Zinc(II) Responsive MRI Contrast Agents by Altering Water Exchange Rates. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14173–14179, doi:10.1021/jacs.5b09158.
4. Lubag, A.J.M.; Leon-Rodriguez, L.M.D.; Burgess, S.C.; Sherry, A.D. Noninvasive MRI of β -cell function using a Zn²⁺-responsive contrast agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 18400–18405, doi:10.1073/pnas.1109649108.
5. Esqueda, A.C.; López, J.A.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzón, J.C.; Ratnakar, J.; Lubag, A.J.M.; Sherry, A.D.; De León-Rodríguez, L.M. A New Gadolinium-Based MRI Zinc Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11387–11391, doi:10.1021/ja901875v.
6. Bonnet, C.S.; Caillé, F.; Pallier, A.; Morfin, J.-F.; Petoud, S.; Suzenet, F.; Tóth, É. Mechanistic Studies of Gd³⁺-Based MRI Contrast Agents for Zn²⁺ Detection: Towards Rational Design. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 10959–10969, doi:10.1002/chem.201403043.
7. Terreno, E.; Castelli, D.D.; Aime, S. Paramagnetic CEST MRI Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2013; pp. 387–425 ISBN 978-1-118-50365-2.
8. Bonnet, C.S.; Tei, L.; Botta, M.; Tóth, É. Responsive Probes. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2013; pp. 343–385 ISBN 978-1-118-50365-2.
9. Kraehmer, V.; Rehder, D. Modelling the site of bromide binding in vanadate-dependent bromoperoxidases. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 5225, doi:10.1039/c2dt12287a.
10. Wohl, A. Bromierung ungesättigter Verbindungen mit *N*-Brom-acetamid, ein Beitrag zur Lehre vom Verlauf chemischer Vorgänge. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1919**, *52*, 51–63, doi:10.1002/cber.19190520109.
11. Blodgett, J.K.; Loudon, G.M. Direct cleavage versus transpeptidation in the autodecomposition of peptides containing 2,4-diaminobutanoic acid (DABA) and 2,3-diaminopropanoic acid (DAPA) residues. Specific cleavage of DAPA-containing peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6813–6821, doi:10.1021/ja00199a049.
12. Gutmann, B.; Roduit, J.-P.; Roberge, D.; Kappe, C.O. A Two-Step Continuous-Flow Synthesis of *N*-(2-Aminoethyl)acylamides through Ring-Opening/Hydrogenation of Oxazolines. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 13146–13150, doi:10.1002/chem.201102772.
13. Pollet, R.; Bonnet, C.S.; Retailleau, P.; Durand, P.; Tóth, É. Proton Exchange in a Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer Agent from Experimental Studies and *ab Initio* Metadynamics Simulation. *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 4317–4323, doi:10.1021/acs.inorgchem.6b02773.

14. Angelovski, G.; Chauvin, T.; Pohmann, R.; Logothetis, N.K.; Tóth, É. Calcium-responsive paramagnetic CEST agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1097–1105, doi:10.1016/j.bmc.2010.07.023.
15. Xu, Y.-Q.; Luo, J.; Chen, Z.-N. Zn²⁺-Responsive Bimodal Magnetic Resonance Imaging and Fluorescence Imaging Agents and Their Interaction with Human Serum Albumin. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014*, 3208–3215, doi:10.1002/ejic.201402197.
16. Sóvágó, I.; Kállay, C.; Várnagy, K. Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2225–2233, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.026.
17. Schirer, A.; El Khoury, Y.; Faller, P.; Hellwig, P. Similarities and differences of copper and zinc cations binding to biologically relevant peptides studied by vibrational spectroscopies. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 581–589, doi:10.1007/s00775-017-1449-0.
18. Fries, P.H.; Belorizky, E. Electronic Spin Relaxation and Outer-Sphere Dynamics of Gadolinium-Based Contrast Agents. In *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A., Helm, L., Tóth, É., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2013; pp. 277–309 ISBN 978-1-118-50365-2.
19. Bonnet, C.S.; Buron, F.; Caillé, F.; Shade, C.M.; Drahoš, B.; Pellegatti, L.; Zhang, J.; Villette, S.; Helm, L.; Pichon, C.; et al. Pyridine-Based Lanthanide Complexes Combining MRI and NIR Luminescence Activities. *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18*, 1419–1431, doi:10.1002/chem.201102310.

Chapitre IV

Détection du Zn(II) par variation de q

Table des matières

1. Introduction.....	174
2. Synthèse des ligands L6 et L7	176
3. Etude des complexes formés avec L7	177
3.1. Détermination de la stoechiométrie des complexes Ln(III)/L7	177
3.2. Etude de la complexation de LnL7 par Zn(II)	178
3.2.1. Etude par luminescence.....	178
3.2.2. Influence du Zn(II) sur la relaxivité de LnL7	181
3.2.3. Profils NMRD.....	182
3.2.4. Sélectivité	183
4. Etude des complexes formés avec L6.....	184
4.1. Détermination de la stoechiométrie des complexes Ln(III)/L6	184
4.2. Etude de la complexation de LnL6 par Zn(II)	185
4.2.1. Etude par luminescence.....	185
4.2.2. Influence du Zn(II) sur la relaxivité de LnL6.....	187
4.2.3. Profils NMRD.....	190
4.2.4. Sélectivité	191
5. Conclusions et perspectives	192
6. Bibliographie.....	194

1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, la conception de complexes de Gd(III) pour la détection du Zn(II) reposant sur une variation du nombre de molécules d'eau directement liées à Gd(III) reste un véritable challenge. En effet, la réponse au zinc va dépendre à la fois de l'entité complexante du Gd(III), de celle du Zn(II) et du linker entre les deux. Pourtant l'obtention de tels composés, en particulier dans le cadre de nos complexes de Gd(III) à base de pyridine et possédant deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination, serait très avantageuse, puisqu'on pourrait en théorie obtenir un Δq de 2. D'autre part, cette variation de q nous permet d'avoir une réponse au Zn(II) à tous les champs magnétiques, ce qui n'est pas le cas avec une variation de τ_R , pour laquelle la réponse est maximale aux champs intermédiaires.

Dans notre démarche de conception rationnelle de complexes pour la détection du Zn(II), nous nous sommes basés sur des résultats précédemment obtenus au laboratoire sur le composé **Gd25** (**Figure IV. 1**) [1]. Ce dernier présente une unité complexante pour Gd(III) similaire à **L1**, une unité DPA modifiée (fonctions carboxylates sur la DPA), ainsi qu'un linker court de type éthyle. Le complexe **Gd25** a montré une très faible relaxivité en absence de Zn(II) ($r_1 = 2.85 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 298 K), ce qui correspond à un mécanisme purement de type sphère externe. Des mesures du nombre de molécules d'eau coordonnées au Ln(III) ont été effectuées sur des analogues d'Eu(III) et ont confirmé l'absence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du Ln(III). Cela signifie que les fonctions carboxylates et/ou les atomes d'azote de l'unité DPA modifiée viennent compléter la sphère de coordination du Gd(III) en absence de Zn(II). Malheureusement, par addition de Zn(II) sur ce complexe, le Gd(III) est relargué et remplacé par le Zn(II). L'étude potentiométrique du composé modèle mimant la sphère de coordination du Gd(III) en présence de Zn(II) a confirmé que le complexe de Zn(II) correspondant était un ordre de grandeur plus stable que le complexe de Gd(III). Il avait été conclu lors des précédentes études au laboratoire qu'une fonction amide ou carboxylate complémentaire était nécessaire pour assurer la stabilité thermodynamique du complexe de Gd(III) en présence de Zn(II).

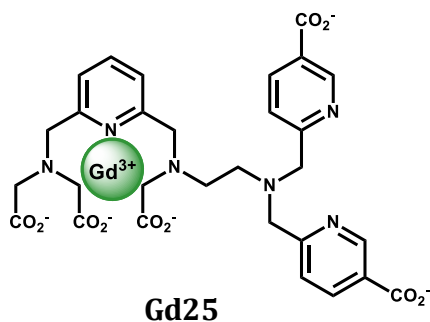


Figure IV. 1 : Structure du complexe **Gd25**

Afin de déterminer si la complexation de l'unité DPA modifiée sur Gd(III) en absence de Zn(II) est due à la longueur du linker et/ou la position des fonctions carboxylates ou si elle est due à l'unité complexante du Gd(III) qui ne possède que 6 atomes coordinants et une charge neutre, nous avons synthétisé les deux ligands **L6** et **L7** (**Figure IV. 2**). L'unité complexante de Gd(III) est similaire à celle de **L2** (7 atomes coordinants, charge -1 en présence de Gd(III)) et permettra de renforcer la stabilité des complexes de Gd(III) en présence de Zn(II). Dans ces deux structures, nous avons varié la position des fonctions carboxylates sur la DPA afin d'étudier l'influence de leur position sur la réponse au Zn(II), tout en gardant un linker de longueur similaire à **Gd25** (espacement de deux atomes de carbone entre les deux atomes d'azote).

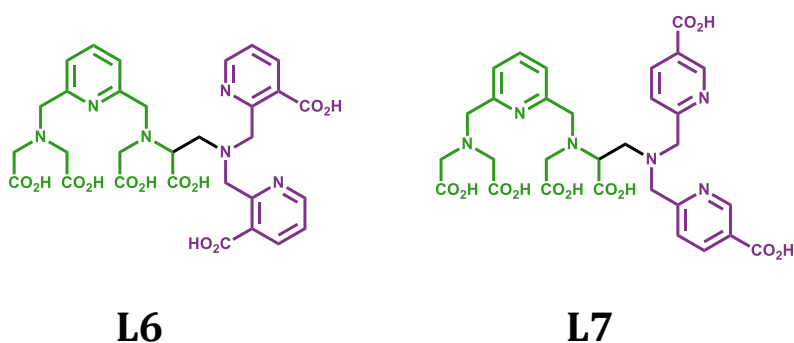


Figure IV. 2 : Structures chimiques des ligands **L6** et **L7**.

2. Synthèse des ligands L6 et L7

Ces ligands ont été synthétisés par des voies similaires. Dans un premier temps, le méthyl 6-(bromométhyl)nicotinate (**42**) a été obtenu de la même manière que le composé **3** du chapitre 2 avec un rendement de 42% (**Schéma IV. 1**).

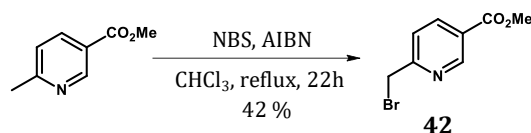


Schéma IV. 1 : Synthèse du composé **42**

La dialkylation de l'amine **38** développée dans le chapitre 3 par les composés **3** ou **42** en présence de carbonate de potassium a conduit respectivement à la formation des précurseurs **43** et **44** avec des rendements satisfaisants de 78 % (**Schéma IV. 2**).

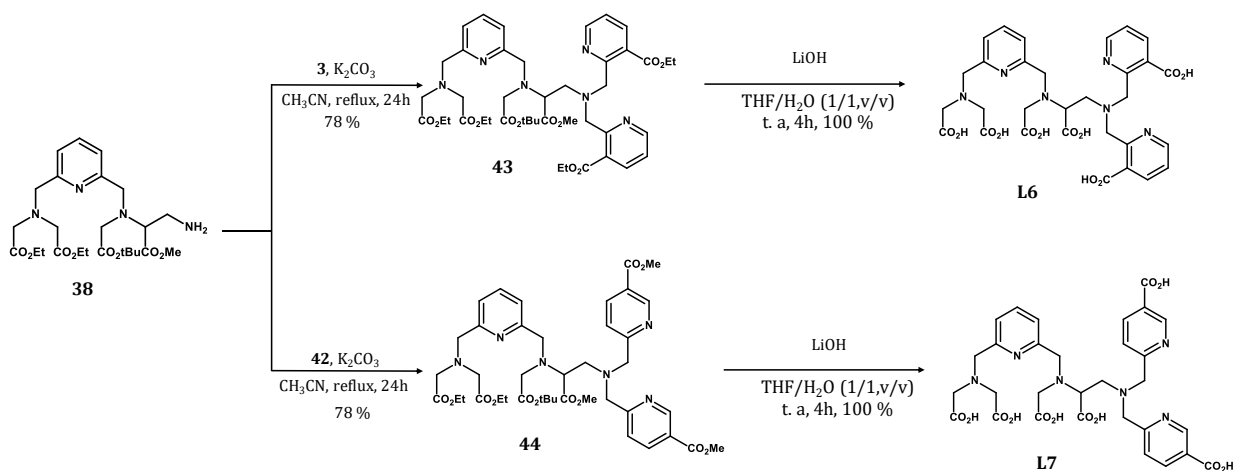


Schéma IV. 2 : Synthèse des ligands **L6** et **L7**

Les ligands finaux sont obtenus après hydrolyse de toutes les fonctions esters. L'hydrolyse des esters éthyliques et méthyliques est effectuée en milieu basique en présence d'hydroxyde de lithium, puis celle de l'ester *tert*-butylique est ensuite réalisée en milieu acide après acidification du milieu par de l'acide chlorhydrique. Les ligands **L6** et **L7** ont été obtenus avec des rendements quantitatifs sur cette dernière étape. Un

rendement global de 12 % pour **L6** et 12 % pour **L7** a été calculé après 8 étapes de synthèse.

3. Etude des complexes formés avec **L7**

3.1. Détermination de la stoechiométrie des complexes Ln(III)/**L7**

Comme ce ligand possède deux sites de complexation, des espèces bimétalliques peuvent être observées. Dans ce cadre, nous avons étudié la formation des complexes de Ln(III), sur l'exemple de l'Eu(III), par luminescence. Nous avons ainsi dosé **L7** par Eu(III) dans l'HEPES 0,1M à 298 K (pH = 7,4), et suivi l'intensité de la bande de luminescence de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ ($\lambda_{em} = 615$ nm) afin de suivre la formation du complexe. Les résultats sont présentés **figure IV. 3**.

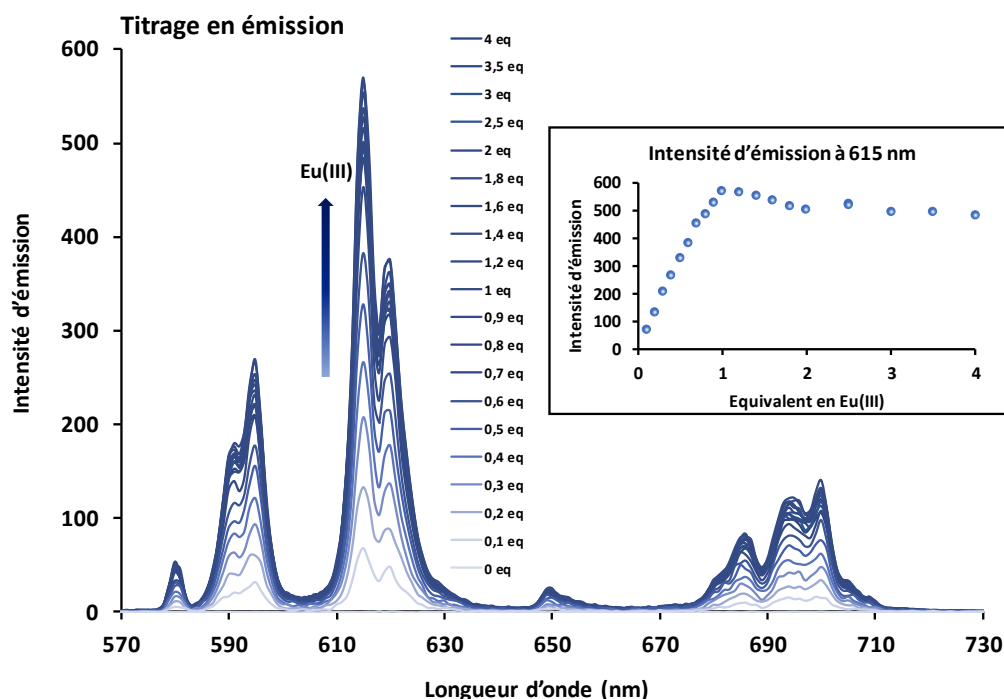


Figure IV. 3 : Evolution du spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 268$ nm) du complexe **EuL7** par addition d'une solution d'Eu(III) au ligand **L7** = 50 μ M dans l'HEPES 0,1M à 298 K (pH = 7,4). Encadré : variation de l'intensité d'émission mesurée à 615 nm en fonction du nombre d'équivalent d'Eu(III) ajouté en solution.

Un spectre d'émission typique de l'Eu(III) est obtenu. L'intensité augmente avec l'ajout d'Eu(III) jusqu'à 1 équivalent. Au-delà une diminution de 12 % d'intensité de luminescence est observée. Ceci peut être dû à la formation d'hydroxo-complexes non solubles et non visibles à l'œil nu. Afin de vérifier cette hypothèse, le même dosage a été effectué dans un tampon N-méthyl pipérazine (NMP) à pH = 5. Les résultats sont présentés dans la **figure IV. 4**. On voit qu'au-delà d'un équivalent d'Eu(III) ajouté, l'intensité de luminescence reste constante, ce qui est en faveur de la formation d'hydroxo-complexes insolubles à des pH plus élevés.

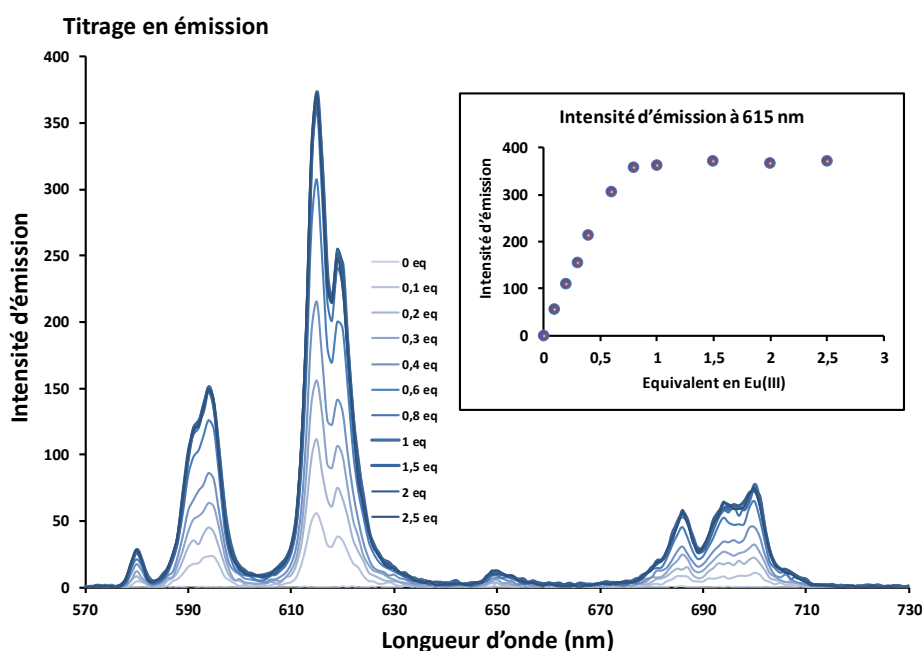


Figure IV. 4 : Evolution du spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 268$ nm) du complexe **EuL7** par addition d'une solution d'Eu(III) au ligand **L7** ($[L7] = 400$ μ M) dans la NMP 0,1M à 298 K (pH = 5). Encadré : variation de l'intensité d'émission mesurée à 615 nm en fonction du nombre d'équivalent d'Eu(III) ajouté en solution.

3.2. Etude de la complexation de LnL7 par Zn(II)

3.2.1. Etude par luminescence

L'étude de l'influence du Zn(II) sur les propriétés de luminescence du complexe **EuL7** a été effectuée dans l'HEPES 0,1 M, pH = 7,4. Les résultats sont présentés dans la **figure IV. 5**.

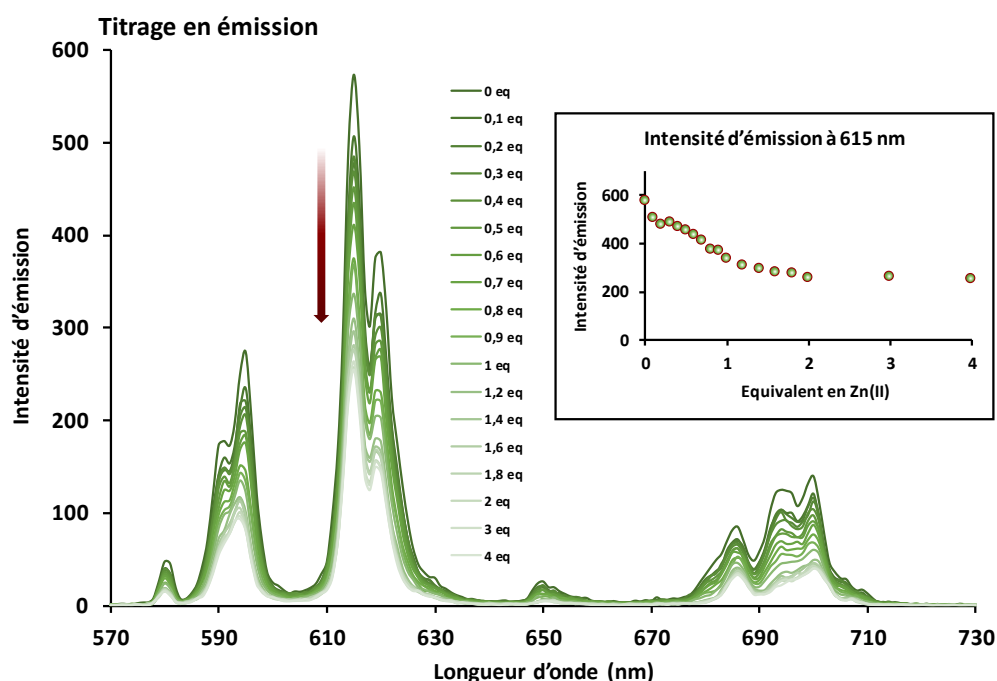


Figure IV. 5 : Evolution du spectre d'émission de luminescence ($\lambda_{\text{exc}} = 268 \text{ nm}$) du complexe **EuL7** ($50 \mu\text{M}$ dans l'HEPES $0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,4$) en fonction de la concentration en Zn(II) . Encadré : variation de l'intensité d'émission mesurée à 615 nm en fonction du nombre d'équivalent de Zn(II) ajouté en solution.

Les données de cette expérience indiquent une diminution d'intensité de luminescence du complexe **EuL7** en fonction du nombre d'équivalent de Zn(II) ajouté. Un quenching de la luminescence d'environ 55 % est observé jusqu'à l'ajout d'environ 2 équivalents de Zn(II) .

Ces résultats ont été complétés par des mesures de temps de vie de luminescence sur le complexe **EuL7** ($50 \mu\text{M}$) en présence d'un équivalent de Zn(II) dans H_2O et dans D_2O . Pour les complexes dans H_2O une décroissance biexponentielle a été trouvée. Cette dernière est fittée selon l'équation suivante :

$$I = A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) \quad \text{IV. 1.}$$

où A_i représentent les facteurs préexponentiels et τ_i les temps de vie.

Deux temps de vie de l'ordre de 0,38 et 1,2 ms sont donc mesurés dans l'eau en absence et en présence de Zn(II). Ces temps de vie très différents signifient que deux espèces coexistent avec des processus de quenching différents et donc sans doute des états d'hydratation très différents.

Le nombre d'hydratation peut être calculé grâce à l'équation empirique de Parker (**Equation IV. 2**). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau IV. 1**.

$$q = 1,2 \times \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - 0,25 \right) \quad \text{IV. 2.}$$

où τ représente le temps de vie de luminescence du complexe dans H₂O ou D₂O.

Tableau IV. 1 : Mesure des temps de vie de luminescence des complexes Eu(III) avec et sans Zn(II) dans l'HEPES 0,1 M, pH = 7,4, ainsi que calcul de q correspondants.

	EuL7		EuL7-Zn	
	Espèce 1	Espèce 2	Espèce 1	Espèce 2
A	316(3)	316(2)	600(4)	59(3)
τ_{H_2O} (ms)	0,38(5)	1,16(8)	0,39(6)	1,26(7)
τ_{D_2O} (ms)	2,06(3)		2,31(7)	
q	2,0(5)	0,1(5)	2,0(5)	0,2(5)

Des nombres d'hydratation de 2 et 0 ont été calculés. En absence de Zn(II), les deux facteurs préexponentiels sont du même ordre de grandeur, ce qui ne reflète toutefois pas le pourcentage des espèces présentes en solution, car le rendement quantique entre en jeu dans ce facteur préexponentiel. Or, le rendement quantique d'une espèce non-hydratée sera beaucoup plus grand que le rendement quantique d'une espèce bishydratée. En présence de Zn(II), le poids de l'exponentielle correspondant à l'espèce de plus petit temps de vie augmente. Il semble raisonnable de penser que les rendements quantiques en absence et en présence de Zn(II) restent similaires (comme les espèces ont des temps de vie similaires). Cela permet de conclure qu'en présence de Zn(II), la

proportion de l'espèce présentant un q égal à 2 augmente, ce qui est en accord avec le quenching de luminescence observé précédemment par ajout de Zn(II).

3.2.2. Influence du Zn(II) sur la relaxivité de **LnL7**

La relaxivité du complexe **GdL7** a été mesurée en fonction de la concentration en Zn(II) à 60 MHz et 298 K dans l'HEPES 0,1 M (**Figure IV. 6**).

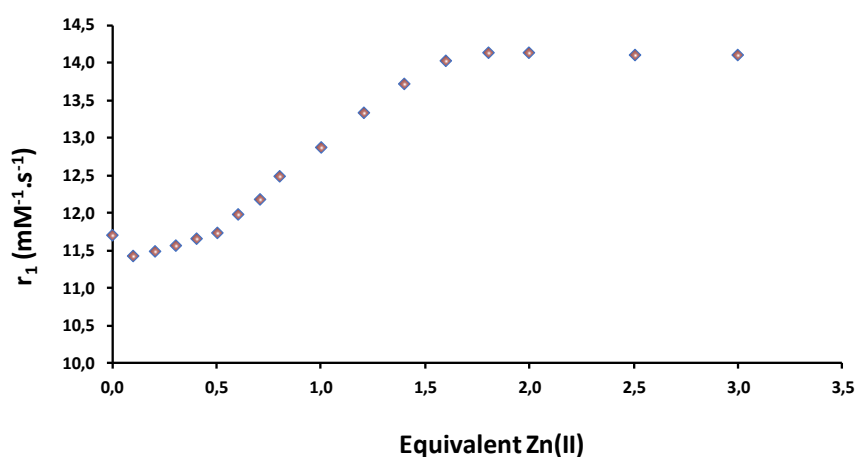


Figure IV. 6 : Relaxivité du complexe **GdL7** à 0,9 mM dans l'HEPES 0,1 M (pH = 7,4) en fonction de la concentration en Zn(II) à 60 MHz et 298 K.

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que la valeur de la relaxivité en absence de Zn(II) est élevée, similaire à celle de complexes bishydratés ($r_1(\text{Gd25}) = 10,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $r_1(\text{Gd26}) = 11,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), et ce malgré la présence d'une espèce à $q = 0$ comme l'attestent les mesures de luminescence. Afin d'éliminer des phénomènes d'agrégation qui pourraient expliquer cette valeur de relaxivité élevée, nous avons réalisé une étude de mesure de l'augmentation du taux de relaxation paramagnétique ($1/T_{1\text{para}}$) en fonction de la concentration en **GdL7**. Les résultats sont présentés dans la **figure IV. 7**.

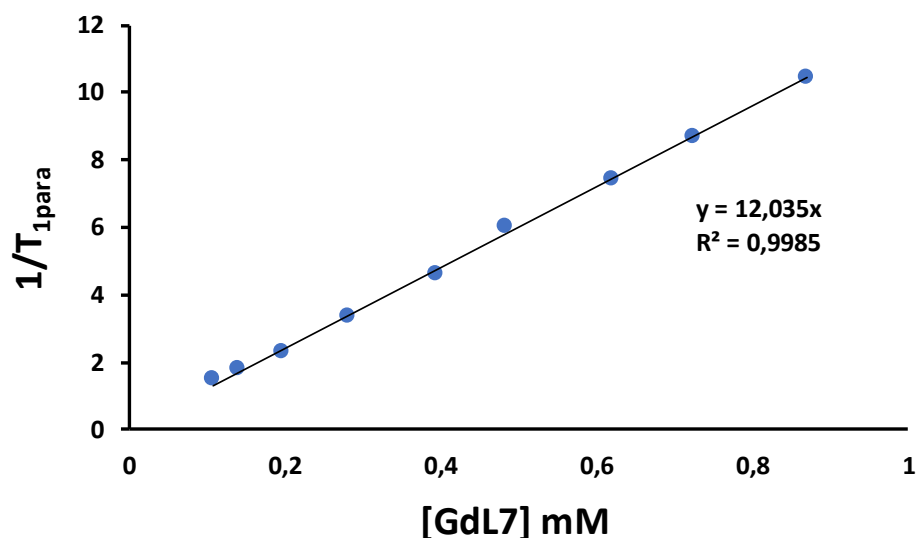


Figure IV. 7 : $1/T_{1para}$ en fonction de $[GdL7]$ en dans l'HEPES 0,1 M, pH 7,4 mesurées à 60 MHz et 298 K.

La dépendance de $1/T_{1para}$ en fonction de la concentration est linéaire, ce qui montre une absence d'agrégation en absence de Zn(II). D'autre part, la valeur de relaxivité élevée de $12 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est confirmée. Ceci signifie que l'espèce avec $q = 0$ est présente en très faible proportion dans la solution. Il sera nécessaire de réaliser des études par RMN de ^{17}O afin de connaître le q moyen présent en solution.

Ensuite lors de l'ajout de Zn(II), la relaxivité augmente faiblement jusqu'à 0,5 équivalent avant d'augmenter d'environ 20 % jusqu'à 1,5 équivalents de Zn(II) ajouté, puis reste constante. Ces résultats sont en accord avec ce qui avait été observé en luminescence et pourraient être expliqués par les faibles variations de q observées.

3.2.3. Profils NMRD

Les profils NMRD du complexe **GdL7** et **GdL7-Zn** ont été réalisés dans l'HEPES 0,1 M à pH = 7,4 entre 20 et 400 MHz (**Figure IV. 8**).

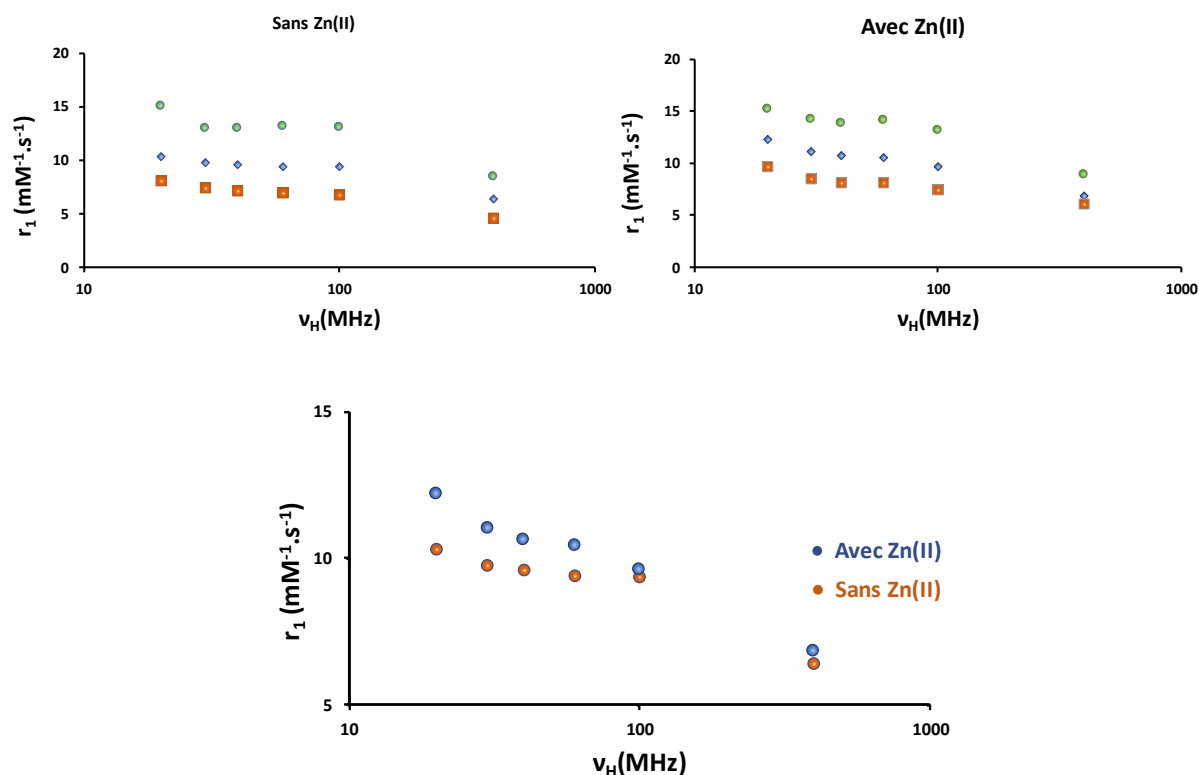


Figure IV. 8 : En haut : Profils NMRD du complexe **GdL7** (1 mM) dans l'HEPES 0,1 M à pH = 7,4) sans (à gauche) et avec Zn(II) (à droite) à 298 K (●), 310 K (◆) et 323 K (■). En bas : Superposition de la variation de la relaxivité à 310 K sans et avec Zn(II).

Les profils NMRD sont caractéristiques de ceux d'une petite molécule. En effet, il n'existe pas de « bosse » caractéristique de molécules à rotation lente aux champs intermédiaires qui serait due à la présence d'une macromolécule. Ces résultats confirment donc l'absence d'agrégation de ce système, en absence et en présence de Zn(II). Les variations de relaxivité observées par ajout de Zn(II) sont d'environ 9 % à tous les champs, confirmant que ces variations peuvent être attribuées au changement de q . Ce pourcentage est en accord avec le pourcentage obtenu lors de la détection de Zn(II) en utilisant seulement 1 équivalent de Zn(II).

3.2.4. Sélectivité

Afin d'évaluer la sélectivité du complexe **GdL7** pour le Zn(II), des mesures de relaxivité ont été réalisées en présence de Ca(II), Mg(II) et Cu(II) (**Figure IV. 9**).

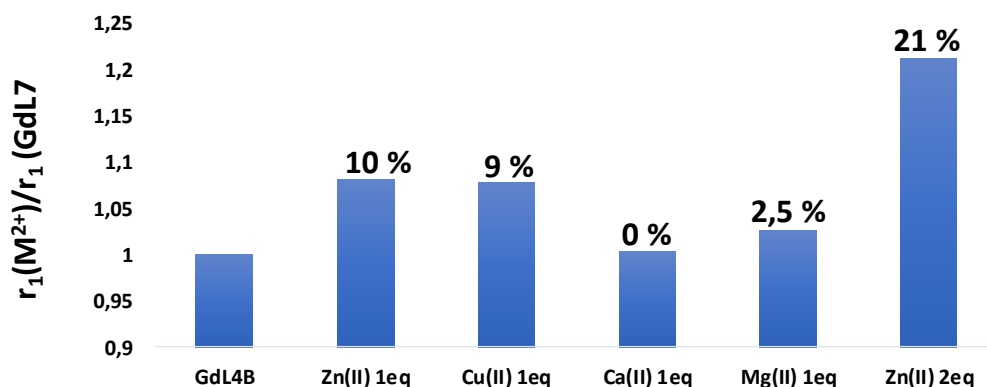


Figure IV. 9 : Etude de la sélectivité du complexe **GdL7** (0,14 mM) en relaxométrie à 60 MHz et 298 K dans l'HEPES 0,1 M pH = 7,4 avec 1 équivalent en cation endogène.

Ces mesures ont été effectuées en présence d'un équivalent de chaque cation métallique. En présence de Ca(II) ou de Mg(II), la variation de relaxivité obtenue n'est pas significative. Par contre une augmentation de relaxivité du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le Zn(II), est observée avec le Cu(II). Nous pouvons donc en déduire que la sélectivité pour le Zn(II) est suffisante puisque la concentration de Cu(II) *in vivo* est beaucoup plus faible que celle de Zn(II).

4. Etude des complexes formés avec L6

4.1. Détermination de la stoechiométrie des complexes Ln(III)/L6

Comme précédemment, nous avons suivi le dosage de **L6** par variation d'intensité de luminescence du complexe **EuL6** en fonction de la concentration en Eu(III) dans l'HEPES 0,1M à 298 K (pH = 7,4). L'intensité de luminescence de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ ($\lambda_{em} = 615$ nm) a été reportée. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure IV. 10**.

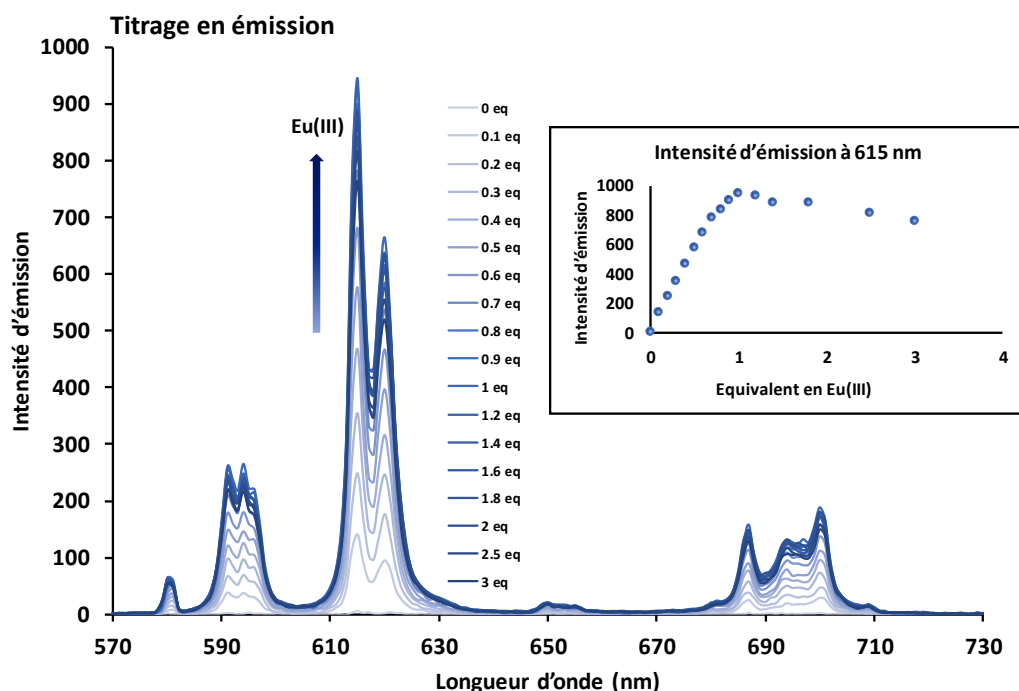


Figure IV. 10 : Evolution du spectre d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 268 \text{ nm}$) de EuL6 avec l'addition d'une solution de Eu(III) à L6 ($[\text{L6}] = 100 \mu\text{M}$) dans l'HEPES 0,1M à 298 K (pH = 7,4). Encadré : variation de l'intensité d'émission mesurée à 615 nm en fonction du nombre d'équivalent d'Eu(III) ajouté en solution.

Une augmentation monotone d'intensité de luminescence est obtenue jusqu'à ajout d'1 équivalent d'Eu(III). Comme pour L7, au-delà d'un équivalent d'Eu(III) ajouté, l'intensité de luminescence diminue faiblement (19 %), indiquant une formation d'hydroxo-complexes insolubles à ce pH.

4.2. Etude de la complexation de LnL6 par Zn(II)

4.2.1. Etude par luminescence

Comme précédemment, nous avons étudié la variation d'intensité de luminescence en fonction du nombre d'équivalent de Zn(II) ajouté. La **figure IV. 11** présente les résultats obtenus pour le complexe EuL6. Les spectres ont été enregistrés à 298 K dans l'HEPES 0,1 M à pH = 7,4.

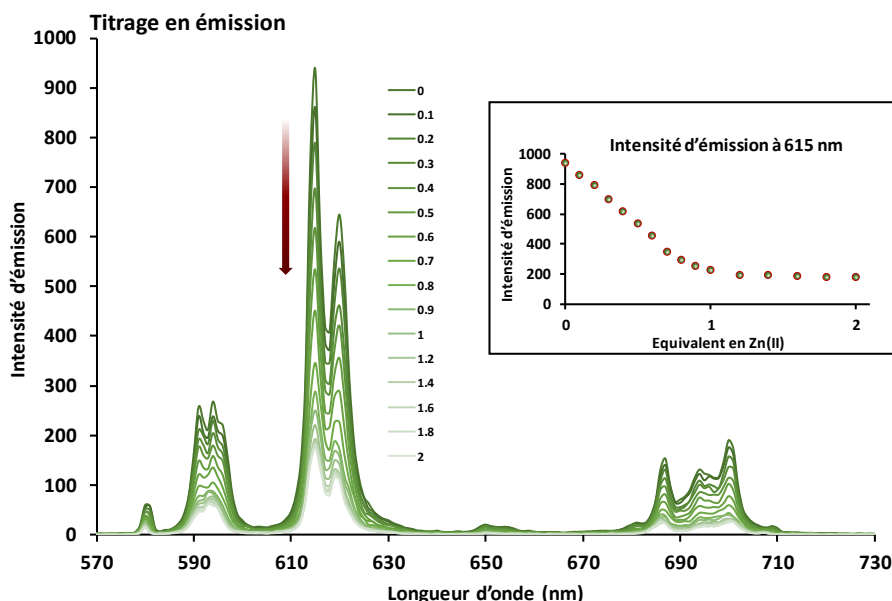


Figure IV. 11 : Evolution du spectre d'émission de luminescence ($\lambda_{\text{exc}} = 268 \text{ nm}$) du complexe **EuL6** (100 μM dans l'HEPES 0,1 M, pH = 7,4) en fonction de la concentration en Zn(II). Encadré : variation de l'intensité d'émission mesurée à 615 nm en fonction du nombre d'équivalent de Zn(II) ajouté en solution.

L'intensité de luminescence diminue de 77 % par ajout d'un équivalent de Zn(II), puis reste constante. Ceci est typique d'un quenching qui pourrait être attribué à un changement du nombre de molécules d'eau directement coordonnées à Eu(III) par ajout de Zn(II). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré les temps de vie de luminescence dans H₂O et D₂O en présence et en absence de Zn(II) (**Tableau II. 2**).

Tableau II. 2 : Mesure des temps de vie de luminescence du complexe **EuL6** avec et sans Zn(II) dans l'HEPES 0,1 M, pH = 7,4.

	EuL6		EuL6-Zn
	Espèce 1	Espèce 2	
A	414(5)	508(3)	
$\tau_{\text{H}_2\text{O}} \text{ (ms)}$	0,36(1)	1,20(1)	0,40(8)
$\tau_{\text{D}_2\text{O}} \text{ (ms)}$		1,91(6)	2,24 (9)
q	2,3(5)	0,1(5)	1,9(5)

En absence de Zn(II), la décroissance de l'intensité de luminescence dans H₂O est biexponentielle, ce qui est caractéristique de la présence de deux espèces en solution. En présence de Zn(II), la décroissance devient monoexponentielle montrant la présence d'une espèce unique en solution. Grâce à l'équation empirique de Parker (**Equation IV. 2**) [2], nous avons pu calculer le nombre des molécules d'eau coordonnées sur le complexe **LnL6** en présence et en absence de Zn(II). Les résultats sont présentés dans le **tableau IV. 2**. En absence de Zn(II), une première espèce représentant un poids de 45% possède un nombre d'hydratation q égal à 2. La deuxième espèce représente un poids de 55% et possède un nombre d'hydratation q égal à 0. En présence de Zn(II), nous observons uniquement une espèce bishydratée.

Ce résultat est en accord avec le phénomène de quenching de l'intensité de luminescence observé. Ceci montre en effet que la première sphère de coordination du Ln(III) est modifiée lors de la complexation du Zn(II) par la DPA modifiée. Par conséquent, les groupements carboxylates ajoutés sur la partie ciblant pour Zn(II) et/ou les atomes d'azote des amines coordinent Gd(III) en absence de Zn(II) et se décoordinent en sa présence. Toutefois comme dans l'exemple précédent, il est impossible de connaître les proportions de chaque espèce (non-hydratée et bishydratée) en absence de Zn(II). Une expérience de mesures des déplacements chimiques en fonction de la température par RMN ¹⁷O sera nécessaire afin de connaître le nombre de molécules d'eau moyen.

4.2.2. Influence du Zn(II) sur la relaxivité de **LnL6**

Une étude de l'influence de Zn(II) sur la relaxivité du complexe **GdL6** a été effectuée. La variation de la relaxivité mesurée à 60 MHz et 298 K dans l'HEPES 0,1 M à pH=7,4 est présentée dans la **figure IV. 12**.

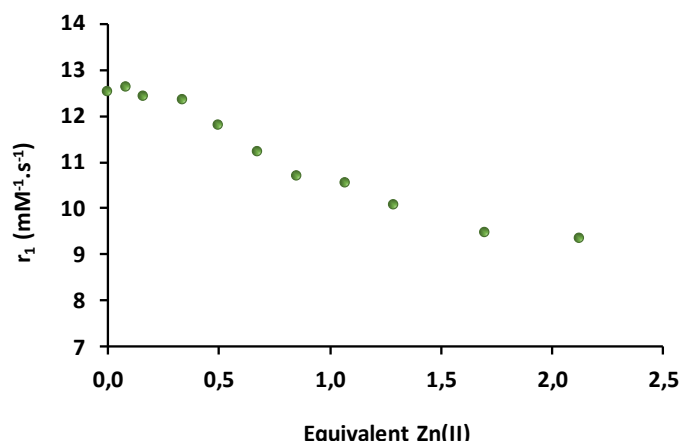


Figure IV. 12 : Relaxivité du complexe **GdL6** à 1,1 mM dans l'HEPES 0,1 M (pH = 7,4) en fonction de la concentration en Zn(II) à 60 MHz et 298 K.

Comme pour **GdL7**, la relaxivité de **GdL6** en absence de Zn(II) est élevée ($r_1 = 12,53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ceci suggère que l'espèce non hydratée est présente en très petite quantité. L'ajout du Zn(II) conduit à diminution de la relaxivité d'environ 24 % avant de rester constante. Ces changements sont surprenants puisqu'ils ne vont pas dans le sens d'une faible augmentation de q . Afin de vérifier si des phénomènes d'agrégation ne peuvent pas interférer, nous avons fait des mesures d'augmentation du taux de relaxation paramagnétique en fonction de la concentration en Gd(III) en présence et en absence de Zn(II). Les résultats sont présentés dans la **figure IV. 13**.

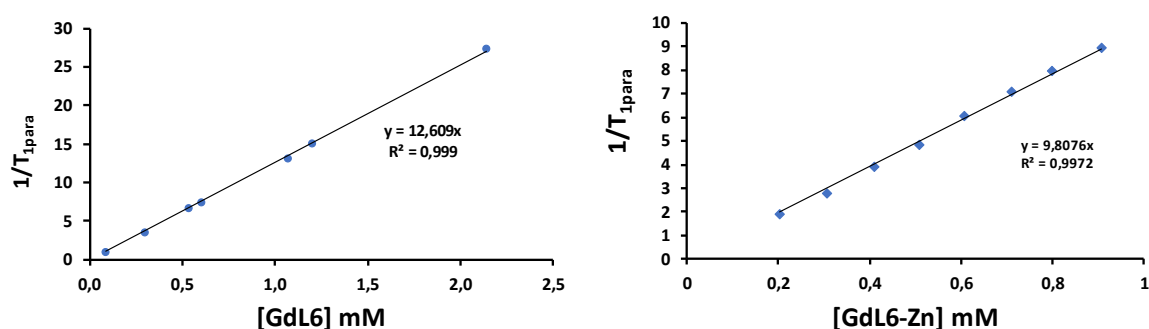


Figure IV. 13 : $1/T_{1\text{para}}$ des complexes **GdL6** et **GdL6-Zn** en fonction de la concentration dans l'HEPES 0,1 M, pH 7,4 mesurées à 60 MHz et 298 K.

Les résultats montrent une absence d'agrégation en absence et en présence de Zn(II). Les profils NMRD ne mettent pas non plus en évidence des phénomènes d'agrégation (voir ci-dessous).

Cette diminution de la relaxivité par ajout de Zn(II) pourrait s'expliquer par deux phénomènes : (1) une diminution de la vitesse d'échange d'eau k_{ex} , (2) une diminution de la contribution de seconde sphère, voire un mélange des deux phénomènes. En effet, nous savons qu'en absence de Zn(II), une espèce non-hydratée et une espèce bishydratée co-existent dans des proportions inconnues mais l'espèce bishydratée est très majoritaire, alors qu'en présence de Zn(II), nous avons uniquement une espèce bishydratée. Les espèces bishydratées en absence et en présence de Zn(II) peuvent avoir des structures différentes. En absence de Zn(II), les fonctions carboxylates de la DPA peuvent se trouver à proximité du Gd(III) permettant ainsi d'augmenter la vitesse d'échange d'eau de cette espèce bishydratée et/ou d'augmenter la contribution de seconde sphère. En présence de Zn(II), la répulsion électrostatique entre Gd(III) et Zn(II) éloignera ces fonctions carboxylates de Gd(III) conduisant à une espèce bishydratée avec une vitesse d'échange plus faible et/ou une contribution de seconde sphère beaucoup plus faible (**Figure IV. 14**).

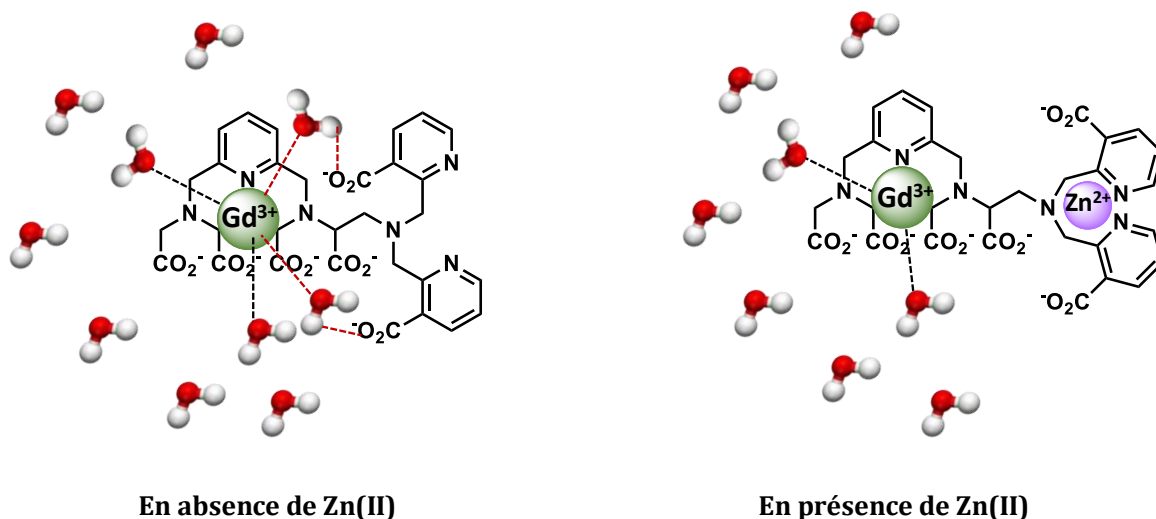


Figure IV. 14 : Représentation schématique des contributions de seconde sphère possiblement différentes pour le complexe **GdL6** en absence et en présence de Zn(II).

La faible augmentation de q serait alors annihilée par cette diminution de vitesse d'échange et/ou contribution de seconde sphère conduisant alors à une diminution de la relaxivité. Des mesures de k_{ex} par RMN ^{17}O sont nécessaires afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse. La contribution de seconde sphère pourrait également être évaluée indirectement en mesurant la relaxivité dans un solvant non protique tel que le dioxane.

4.2.3. Profils NMRD

Des profils NMRD ont également été mesurés en présence et en absence de Zn(II) dans l'HEPES 0,1 M à pH=7,4 (**Figure IV. 15**) entre 20 et 400 MHz.

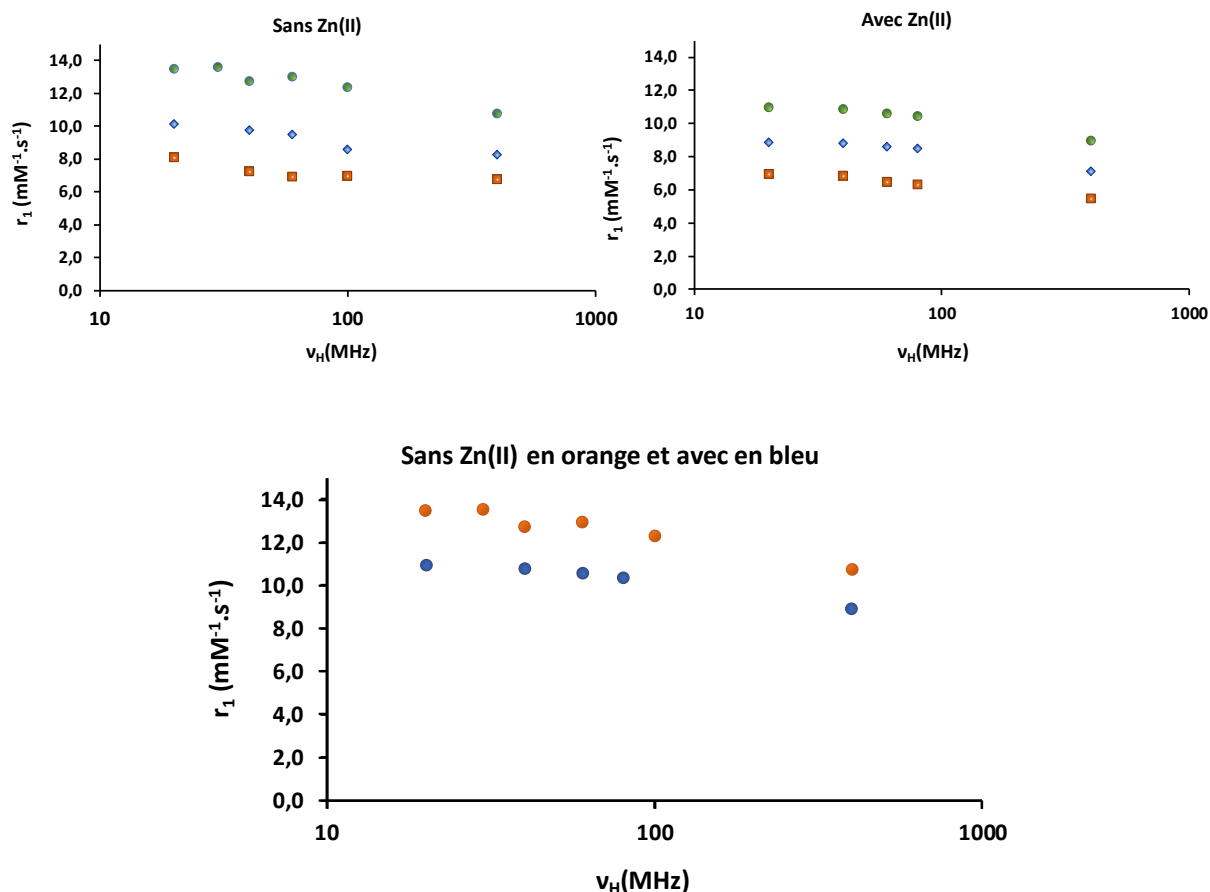


Figure IV. 15 : En haut : Profils NMRD du complexe **GdL6** (1 mM) dans l'HEPES 0,1 M à pH = 7,4) sans (à gauche) et avec Zn(II) (à droite) à 298 K (●), 310 K (◆) et 323 K (■). En bas : superposition de la variation de la relaxivité à 298 K sans et avec Zn(II) .

Les profils obtenus sont similaires aux profils de petites molécules présentés dans la littérature (**Gd25**, **Gd26** et **GdPy**) [1], [3] et confirment l'absence de tout phénomène d'agrégation. Une différence de relaxivité d'environ 18 % est présente à tous les champs sans ou avec Zn(II).

4.2.4. Sélectivité

Dans le but d'étudier la sélectivité du complexe **GdL6** pour le Zn(II) (1 eq. en zinc), sa relaxivité a été comparée à celle du complexe **GdL6** en présence de 1 équivalent de cations endogènes (Ca(II), Mg(II) et Cu(II)) à 60 MHz et 298 K dans l'HEPES 0,1 M (**Figure IV. 16**)).

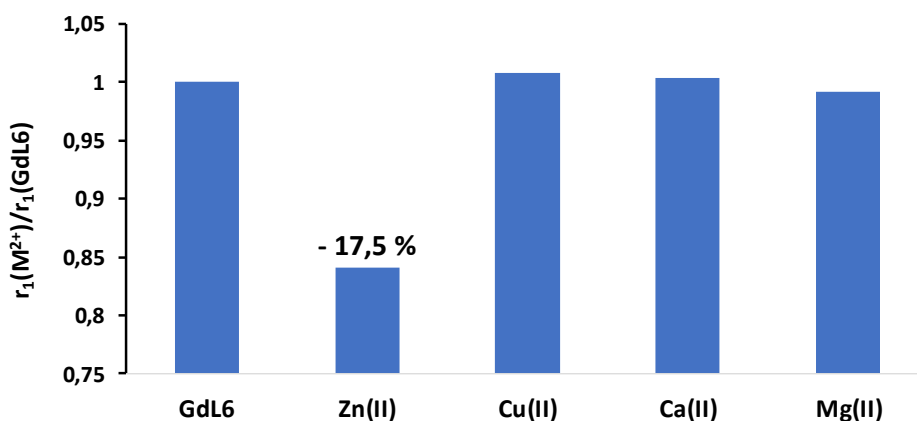


Figure IV. 16 : Comparaison des relaxivités mesurées à 60 MHz et 298 K pour le complexe **GdL6** (1,2 mM) en présence de 1 équivalent de cation endogène dans l'HEPES 0,1 M à pH= 7,4.

Aucune influence sur la relaxivité du complexe **GdL6** n'est observée en présence de Ca(II), Mg(II) et Cu(II). La sélectivité par rapport au Cu(II) en particulier est remarquable. Sachant que l'affinité de l'unité DPA modifiée est très forte pour le Cu(II) (voir chapitre 2 composé modèle **L3B**), cette forte sélectivité s'explique sans doute par ces changements structuraux différents en présence de Zn(II) et Cu(II) et viendrait conforter notre hypothèse précédente. Bien entendu des expériences supplémentaires pour élucider le mécanisme et comprendre cette forte sélectivité sont nécessaires. Une variation de la

relaxivité est observée en présence de Zn(II) indiquant une excellente sélectivité pour le zinc vis-à-vis des cations endogènes.

5. Conclusions et perspectives

Deux ligands **L6** et **L7** comportant un motif pyridine destiné à la complexation d'un Ln(III) et un motif DPA modifié destiné à la complexation de Zn(II) ont été présentés dans ce chapitre. Des fonctions carboxylates ont été ajoutées à différentes positions sur la pyridine de la DPA et le linker utilisé est similaire à celui de **25**.

Au vu des résultats obtenus, plusieurs conclusions peuvent être tirées sur la conception des agents de contraste sensibles au Zn(II) :

- (1) La sphère de complexation de Gd(III) joue un rôle prépondérant dans la coordination potentielle de l'unité DPA modifiée sur le Gd(III) en absence de Zn(II)
- (2) La position des fonctions carboxylates sur la DPA induit des réponses au Zn(II) très différentes.

En effet, pour le premier point, la comparaison de **Gd25** avec **GdL7** est pertinente puisque la seule différence entre les deux complexes est l'ajout d'une fonction carboxylate dans la sphère de coordination du Gd(III). Tout d'abord, il faut noter que cet ajout a permis d'obtenir un complexe de Gd(III) stable en présence de Zn(II). En absence de Zn(II), le complexe **Gd25** est non-hydraté, alors que le complexe **GdL7** est présent sous deux formes, une forme non hydratée et une forme bishydratée, la proportion de complexe bishydratée étant beaucoup plus importante. Cette différence peut s'expliquer par trois facteurs :

- L'encombrement stérique autour de Gd(III) est beaucoup plus important dans **GdL7** que dans **Gd25** car les nombres de coordination respectifs sont de 7 et 6
- la charge locale autour de Gd(III) est -1 dans **GdL7**, ce qui ne favorise pas la coordination d'une unité chargée négativement (la charge est neutre dans **Gd25**)
- la géométrie de coordination des deux molécules d'eau dans **GdL7** ne favorise pas leur remplacement par d'autres fonctions coordinantes.

Concernant le deuxième point, il apparaît évident que la position des fonctions carboxylates est cruciale pour la réponse au Zn(II) comme le prouvent les comparaisons des réponses de **GdL6** et **GdL7**. Les positions des carboxylates en ortho et para de la méthylamine induisent des réponses au Zn(II) opposées. Dans les deux cas, on observe un mélange d'espèces non-hydratée (minoritaire) et bishydratée (majoritaire) en absence de Zn(II) dans des proportions qui doivent être déterminées par des mesures de RMN ^{17}O . L'ajout de Zn(II) fait disparaître ou grandement diminuer la proportion d'espèce non hydratée. Il y a donc une augmentation de q par ajout de Zn(II). Pour **GdL7**, la relaxivité augmente par ajout de Zn(II) en accord avec cette augmentation de q . Au contraire pour **GdL6**, la relaxivité diminue par ajout de Zn(II) en contradiction avec l'augmentation de q . Ceci peut s'expliquer par la position des fonctions carboxylates qui seraient plus propices à former des liaisons H avec les molécules d'eau liées au Gd(III) et ainsi accélérer la vitesse d'échange et/ou favoriser les contributions de seconde sphère. Il faut noter que cet effet est également relié à la faible flexibilité du linker, puisque ce phénomène n'a pas été observé pour **GdL2** qui diffère de **GdL6** par la longueur du linker. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour élucider ce dernier mécanisme mais la molécule **GdL6** reste très intéressante pour la détection du Zn(II) en particulier pour sa sélectivité vis-à-vis du Cu(II). C'est le premier exemple de molécule présentant une aussi bonne sélectivité pour le Zn(II) par rapport au Cu(II), le meilleur exemple jusqu'à présent avait été développé par Mishra, Parker et *al.* et leur molécule possède une réponse au Cu(II) de 25 % environ contre une réponse au Zn(II) de 70 % [4].

Cette étude structurale montre la complexité de développer des complexes répondant au Zn(II) par des variations de q et combien à la fois le site de complexation du Gd(III), le linker et l'unité complexante du Zn(II) sont étroitement liés au mécanisme de réponse.

6. Bibliographie

- [1] C. S. Bonnet *et al.*, "Mechanistic Studies of Gd³⁺-Based MRI Contrast Agents for Zn²⁺ Detection: Towards Rational Design," *Chem. – Eur. J.*, vol. 20, no. 35, pp. 10959–10969, Aug. 2014, doi: 10.1002/chem.201403043.
- [2] A. Beeby *et al.*, "Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, no. 3, Art. no. 3, 1999, doi: 10.1039/a808692c.
- [3] C. S. Bonnet *et al.*, "A Pyridine-Based Ligand with Two Hydrazine Functions for Lanthanide Chelation: Remarkable Kinetic Inertness for a Linear, Bishydrated Complex," *Inorg. Chem.*, vol. 54, no. 12, Art. no. 12, Jun. 2015, doi: 10.1021/acs.inorgchem.5b00804.
- [4] A. Mishra, N. K. Logothetis, and D. Parker, "Critical In Vitro Evaluation of Responsive MRI Contrast Agents for Calcium and Zinc," *Chem. – Eur. J.*, vol. 17, no. 5, pp. 1529–1537, Feb. 2011, doi: 10.1002/chem.201001548.

Chapitre V

Utilisation de sondes bimodales IRM/imagerie nucléaire : Vers la quantification du Zn(II) in vitro

Table des matières

1. Introduction.....	199
2. Tomographie par Emission MonoPhotonique	200
2.1. Principe	200
2.2. Choix du lanthanide radioactif	202
3. Production, purification, détection par Nano SPECT/CT et complexation.....	204
3.1. Production	204
3.2. Purification	206
3.3. Détection par Nano SPECT/CT	207
3.4. Complexation de l' ¹⁶⁵ Er(III)	208
4. Principe et quantification du Zn(II)	209
4.1. Principe de la quantification	209
4.2. Quantification du Zn(II)	210
5. Conclusions et perspectives	213
6. Bibliographie.....	215

1. Introduction

L'objectif principal de cette thèse est de valider *in vitro* une méthode de la quantification de Zn(II) en combinant deux techniques d'imagerie médicale, l'IRM et le TEMP.

L'imagerie par résonance magnétique avec son excellente résolution spatiale et temporelle est particulièrement adaptée à l'imagerie moléculaire car l'efficacité (relaxivité) des agents de contraste peut être modulée par un paramètre physiologique. Dans d'autres techniques d'imagerie, telles que les techniques d'imagerie nucléaire (TEP et TEMP), l'intensité du signal émis par une sonde d'imagerie ne peut être modifiée par des paramètres physiologiques. Par contre, ces techniques ont l'avantage de produire un signal qui dépend directement de la quantité de la sonde présente, ce qui en fait des techniques quantitatives. Malgré la différence de sensibilité entre les deux techniques (pM pour l'imagerie nucléaire vs mM pour l'IRM)[1], [2] et la résolution (5-10 mm pour l'imagerie nucléaire et 10-100 μ m pour l'IRM), la combinaison d'IRM-TEP ou IRM-TEMP est utile soit pour obtenir des informations complémentaires, soit pour effectuer une détection quantitative. Dans ce dernier cas, l'IRM est la technique responsive et le TEP ou TEMP est la technique quantitative [3]. Aujourd'hui le challenge est d'utiliser cette combinaison pour l'imagerie moléculaire puisque bien que largement reconnu comme utile, les publications sur les agents d'imagerie bimodale pour la détection quantitative restent rares. Ils ont été appliqués à la détection quantitative du pH [4], mais pas à la détection quantitative des cations.

Pourtant, comme nous l'avons souligné dans le chapitre 1, il serait très important de quantifier le zinc, puisque sa distribution est souvent mal connue malgré son rôle important, tant dans les processus biologiques que dans les processus pathologiques.

Notre approche pour la quantification de Zn(II) est d'utiliser des sondes d'imagerie bimodales et plus particulièrement des complexes de deux lanthanides, l'un étant actif en IRM et l'autre en imagerie nucléaire (TEMP) (**Figure V. 1**). Ces complexes sont mélangés dans des proportions respectant la sensibilité des deux techniques, et en raison du comportement chimique similaire des Ln(III), nous attendons une biodistribution identique. Les informations qui seront obtenues par la tomographie par

émission monophotonique nous permettront d'évaluer la concentration de l'agent de contraste IRM et ainsi remonter de façon non ambiguë à la concentration du zinc.

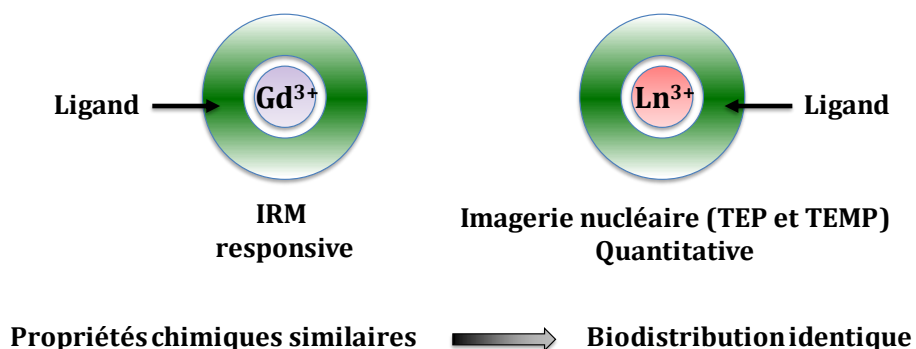


Figure V. 1 : Illustration des sondes d'imagerie bimodales pour la quantification de Zn(II).

2. Tomographie par Emission MonoPhotonique

2.1. Principe

La tomographie par émission monophotonique, ou SPECT en nomenclature anglo-saxonne (Single Photon Emission Computed Tomography), est une technique d'imagerie médicale basée sur l'utilisation d'un élément radioactif émetteur de rayonnements gamma généralement incorporé ou complexé (dans le cas d'un ion métallique) avec des molécules et injecté dans le corps. Lorsque cette sonde radiomarquée est administrée au patient par injection intraveineuse, la désintégration du radioisotope conduit à l'émission d'un seul photon gamma mesurée directement par une caméra adaptée qui tourne autour du patient, appelée caméra gamma à scintillation (**Figure V. 2**). Ainsi, la distribution du radioisotope est déterminée après traitement informatique des données acquises. Cela permet d'obtenir des cartes tomographiques de la zone étudiée.

Un isotope radioactif se caractérise par un nombre de neutrons supérieur à celui de l'atome stable dans son noyau. Cette grande proportion le rend instable. Ainsi, il cherche à retrouver la configuration électronique stable la plus proche de sa composition en émettant des particules et/ou des photons. Ces photons ont une énergie variable suivant

la nature du radioélément. Les radioisotopes classiques utilisés en TEMP et leurs caractéristiques sont présentés dans le **tableau V. 1**.

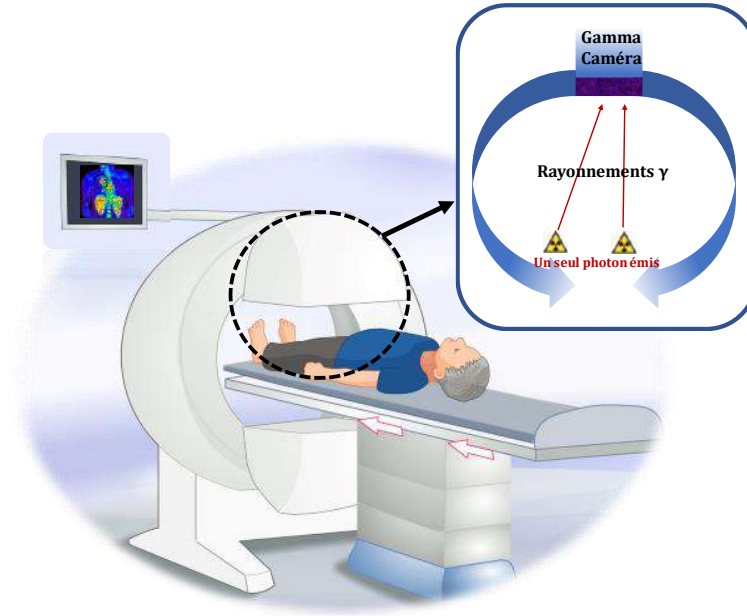


Figure V. 2 : Principe de la tomographie par émission monophotonique. Image adaptée du site <http://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx>

Pour les analyses radioisotopiques, il est important de comprendre la notion de la décroissance radioactive. En effet, elle correspond à la réduction du nombre de noyaux radioactif dans un échantillon au cours du temps. Cette décroissance radioactive se produit jusqu'à ce que tous les noyaux de l'échantillon soient stables. Il est donc possible de quantifier le nombre de noyaux radioactifs à un instant t en mesurant son activité. Ainsi, la loi de la décroissance radioactive est exprimée par l'équation V. 1 où A_t est l'activité de l'échantillon à un instant t et s'exprime en Bq, A_0 est son activité à $t=0$,

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \quad \text{V.1}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad \text{V.2}$$

$$m = \frac{A \times A_r \times t_{1/2}}{\ln 2 \times N_A} \quad \text{V. 3}$$

λ représente la constante radioactive du radionucléide étudié. Cette grandeur exprimée en inverse du temps est reliée à la période radioactive $t_{1/2}$ par l'équation V.2. Dans l'équation V.3 qui relie l'activité à la masse de l'échantillon, A est l'activité de l'échantillon, N_A le nombre d'Avogadro, A_r la masse atomique relative.

Tableau V. 1 : radioisotopes émetteurs de γ utilisés en imagerie TEMP [5], [6].

Emetteurs de γ	Energie (keV)	$t_{1/2}$ (h)
^{99m}Tc	140	6
^{123}I	159	13
^{111}In	172 et 245	67
^{67}Ga	93, 184 et 300	78

2.2. Choix du lanthanide radioactif

Un isotope radioactif a des propriétés chimiques identiques à celui de l'élément stable correspondant, cependant les propriétés physiques sont différentes. Le choix du radioisotope pour une utilisation en imagerie médicale va dépendre de nombreux paramètres : (1) la disponibilité et le prix de l'élément de départ, (2) le mode de production du radionucléide, (3) sa pureté (ou facilité de purification), (4) son activité spécifique, (5) son processus de désintégration (type de rayonnement émis et énergie des particules), (6) son temps de demi-vie.

Les lanthanides ont des isotopes présentant des propriétés physiques intéressantes pour des applications médicales. De tous les lanthanides, le ^{153}Sm , l' ^{166}Ho (thérapie) et le ^{177}Lu (thérapie et imagerie) sont les plus explorés pour une application potentielle en médecine nucléaire [7]–[10].

Parmi les radioisotopes de Ln(III), le plus exploré pour des applications en médecine nucléaire est le ^{177}Lu car c'est le seul à être disponible commercialement. Cependant, son temps de demi-vie de 6.6 jours n'est pas optimal pour une application en imagerie. Il faut souligner qu'Aime *et al.* ont utilisé l' ^{166}Ho pour réaliser une quantification du pH [4]. L' ^{166}Ho a été produit à partir de $^{\text{nat}}\text{Ho}$, ce qui rend toute purification du produit

radioactif difficile, voire impossible. Ils ont donc dû utiliser des concentrations de complexe d'Ho(III) d'environ 15 mM afin d'obtenir une quantité de ^{166}Ho détectable. Si ceci reste faisable pour une quantification du pH, ce n'est absolument pas adapté à la quantification d'un cation métallique, qui doit être détecté à des concentrations de l'ordre du mM au μM . La quantité totale de complexe (Gd(III) + Ln(III) radioactif) doit rester au maximum de l'ordre du mM.

Il sera donc nécessaire de pouvoir purifier le Ln(III) radioactif pour le séparer de l'élément froid dont il est issu.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi, dans le cadre de ma thèse, de nous concentrer sur l' ^{165}Er . Ses propriétés sont présentées dans le **tableau V. 2**.

Tableau V. 2 : Caractéristique du radioisotope choisi

Radioisotope	^{165}Er
	$^{165}\text{Ho}(\text{p},\text{n})^{165}\text{Er}$
Réaction nucléaire	$^{165}\text{Ho}(\text{d},2\text{n})^{165}\text{Er}$
Temps de demi-vie (h)	10,36
Energie de photon et rendement	RX 47-55 keV (82%)
Image	TEMP
Emission d'un électron Auger (intéressant pour la thérapie)	

L' ^{165}Er est produit à partir de ^{165}Ho , disponible commercialement et d'abondance naturelle de 100%. C'est un émetteur gamma avec des énergies comprises entre 47 et 55 keV (dans la gamme de rayon-X). Sa faible énergie est compatible avec la tomographie par émission monophotonique, et son émission d'un électron Auger permet de l'utiliser en thérapie. Son temps de demi-vie de 10 heures et 21 minutes est compatible à la fois avec la complexation de ce dernier par des ligands macrocycliques ou linéaires, mais aussi avec le temps d'expérience en imagerie nucléaire. Cet isotope n'a pas été beaucoup

étudié et utilisé en imagerie médicale. Pourtant sa production avait été présenté depuis 1950 par Butement [11] et son intérêt dans le domaine de la médecine nucléaire avait été annoncé depuis 1977 par Dandamudi Rao, Rodney Ice et leurs collaborateurs [12]–[14]. Même si Hal Anger a introduit la γ -caméra comme technique de détection capable d'imager une distribution d'activité d'un radionucléide depuis 1953 [15], le retard dans l'utilisation de l' ^{165}Er en imagerie est lié à sa faible énergie qui n'était pas adapté aux équipements [12]. L'évolution des techniques de détection a permis de progresser sur ce point et en 2011, il a été confirmé que l' ^{165}Er est adapté à la tomographie par émission monophotonique [16].

3. Production, purification, détection par Nano SPECT/CT et complexation

3.1. Production

La production de radioélément peut être réalisée en bombardant des cibles stables avec des particules, telles que des neutrons, produits dans des réacteurs nucléaires ou des particules chargées produites dans des cyclotrons. Suivant le temps de demi-vie du radioélément, la production ainsi que la livraison doivent être adaptées. Dans notre cas, le cyclotron a été utilisé pour la production de l' ^{165}Er .

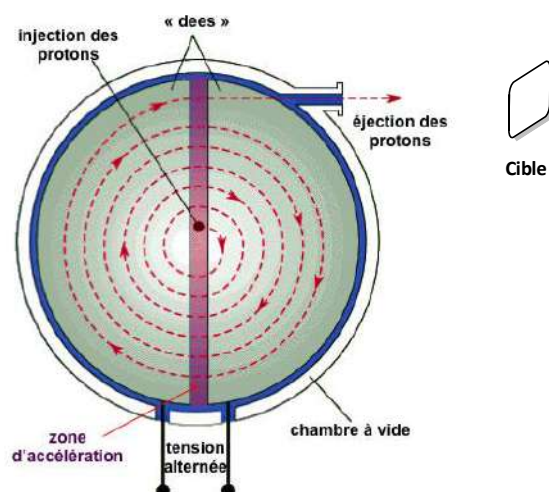


Figure V. 3 : Principe de fonctionnement du cyclotron (adapté de <https://cosmologie.wordpress.com/subatomique/protons-et-neutrons/accelerateurs/>).

Inventé par Ernest Orlando Lawrence en 1931 [17], un cyclotron est un accélérateur circulaire de particules. Il est basé sur l'introduction de particules électriquement chargées de hautes énergies (1 à 100 MeV) entre deux demi-cylindres (« dees ») entre lesquels sont présents un champ électrique, ainsi qu'un champ magnétique (**Figure V. 3**). Les particules sont ensuite dirigées vers l'un des deux demi-cylindres. En raison du champ magnétique, les particules présentent une force magnétique et se déplacent selon une trajectoire circulaire. Lorsque les particules sont à l'intersection des deux demi-cylindres, la polarité est inversée. Par conséquent, les particules sont accélérées de nouveau jusqu'à atteindre l'énergie adéquate. Elles se retrouvent expulsées vers la cible pour donner lieu à une réaction nucléaire.

Nous avons effectué cette partie du travail en collaboration avec Isidro da Silva du laboratoire CEMHTI (Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation) d'Orléans. Ce laboratoire est doté d'une très forte capacité scientifique et technique dans le domaine de la science des matériaux, avec une recherche fondamentale dans des conditions extrêmes (pression, température et irradiation). Depuis 1980, le CEMHTI est un pionnier national dans la production de radionucléides pour la médecine, par des particules chargées avec un cyclotron. Il est donc équipé pour la production, ainsi que pour la purification de l' ^{165}Er .

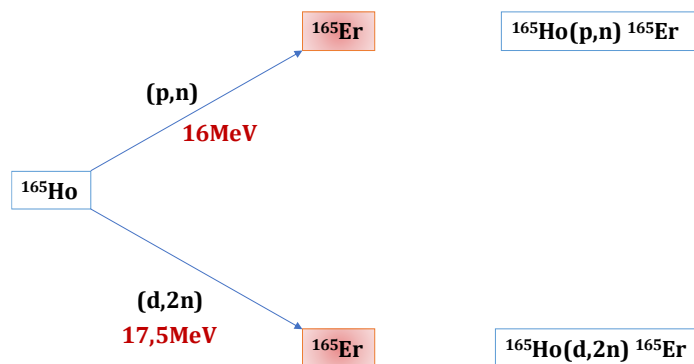


Figure V. 4 : Production de l' ^{165}Er (III) à partir de l'holmium naturel.

Deux voies de production de l' ^{165}Er dans un cyclotron ont été exploitées à partir d'une feuille d'holmium naturel : (1) irradiation avec des protons à 16 MeV pour produire de ^{165}Er ($^{165}\text{Ho}(p,n)^{165}\text{Er}$); (2) irradiation par des deutérons (noyau de l'atome de

deutérium, constitué d'un proton et d'un neutron) à 17,5 MeV conduisant à la production d' ^{165}Er et ^{166}Ho (**Figure V. 4**). Quelle que soit la voie de production choisie, l' ^{166}Ho et l' $^{\text{nat}}\text{Ho}$ doivent être séparés de l' ^{165}Er . L'avantage d'utiliser des protons comme source d'irradiation est de conduire à une production de ^{166}Ho en plus faible quantité. Cependant, l'irradiation avec des deutérons est plus efficace (plus d'activité produite à temps égal).

L' ^{165}Er a pu être obtenu avec une activité spécifique EOB (fin-de-bombardement) de 500 kBq/mg.μA.h, pour une irradiation de 2h, de protons à 16MeV et 2μA.

3.2. Purification

Une séparation par chromatographie échangeuse d'ions sur une résine 2-ethylhexylphosphic mono 2-ethylhexyl ester LN2 (Triskem, Bruz, France) avec un gradient d'éluant HNO_3 (0,3 M – 1 M) a permis de séparer l' ^{165}Er de $^{166}/^{\text{nat}}\text{Ho}$. Cette étape a été suivie par enregistrement des spectres d'énergie obtenus avec une mini gamma caméra (**Figure V. 5**). Un pic d'énergie caractéristique de l' ^{165}Er est observé à environ 51 keV. Le pic d' ^{166}Ho quant à lui est observé à 80 keV. Avant la purification, les deux isotopes sont observés. Cependant, le pic d'énergie caractéristique d' ^{166}Ho disparaît après la purification. Cela confirme la séparation de l' ^{165}Er et l' ^{166}Ho et donc celle de l' ^{165}Er et l' $^{\text{nat}}\text{Ho}$.

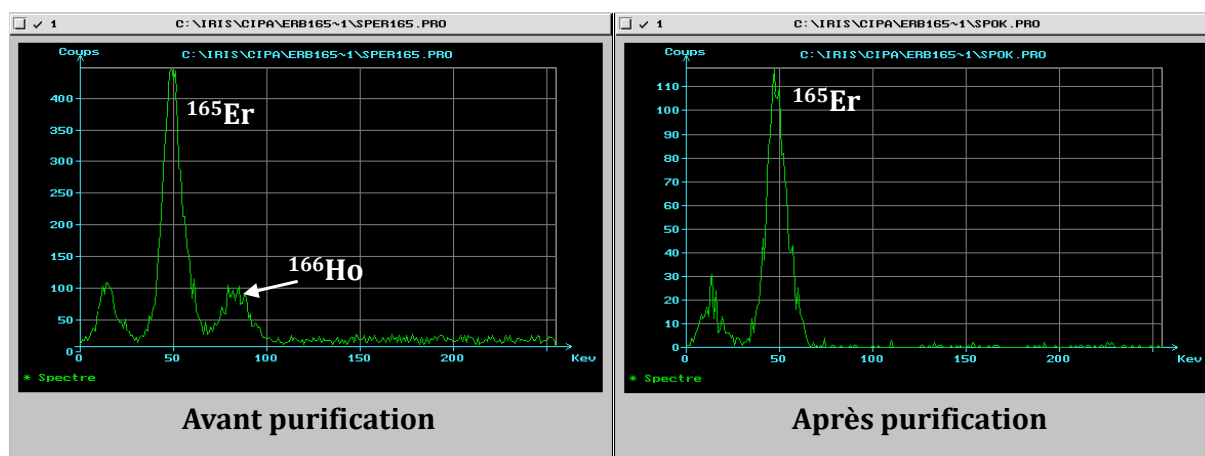


Figure V. 5 : Spectres d'énergie obtenus avec la mini gamma caméra avant et après purification.

3.3. Détection par Nano SPECT/CT

Il est important de vérifier la détection de ^{165}Er avec un imageur SPECT préclinique, afin d'envisager une potentiel application *in vivo* de cet isotope. Les images sur l'imageur SPECT/CT et la γ -caméra 2D ont été effectuées au Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA), institut spécialiste en imagerie préclinique, aussi implanté sur le Campus CNRS d'Orléans.

Dans ce cadre, nous avons enregistré une image d'un tube eppendorf contenant une solution d' ^{166}Er à 9,5 MBq (**Figure V. 6. A**). Cette image confirme la détection de ^{165}Er dans un appareil nano SPECT/CT (Mediso, Bioscan). Par la suite, nous avons voulu vérifier que l'atténuation qui sera obtenue dans un petit animal ne sera pas un frein à la détection de ^{165}Er . Pour cela, nous avons utilisé un fantôme d'atténuation « souris » (fantôme remplie d'eau simulant une souris). Les résultats sont présentés **figure V. 6B**.

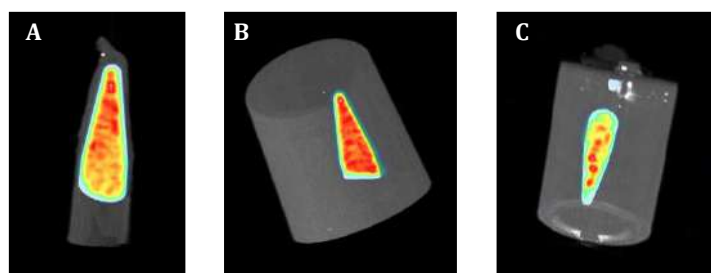


Figure V. 6 : A) Image d'un tube eppendorf contenant une solution d' $^{165}\text{Er(III)}$ à 9,5 MBq. B) Image d'un tube eppendorf contenant une solution d' $^{165}\text{Er(III)}$ à 9,5 MBq dans un fantôme d'atténuation « souris ». C) Image d'un tube eppendorf contenant une solution d' $^{165}\text{Er(III)}$ à 0,18 MBq dans un fantôme d'atténuation « souris ».

Une atténuation d'environ 14 % est obtenue avec le fantôme d'atténuation « souris ». Ceci reste très correct par rapport aux activités détectable en imagerie γ ou rayon X. On peut également confirmer que l'appareil nano SPECT/CT permet de détecter l' $^{165}\text{Er(III)}$ même à de faibles activités (0.18 MBq) (voir fantôme d'atténuation souris **Figure V. 6C**). Dans un premier temps, la reconstitution des images présentées dans la **figure V. 6** ont été faites en utilisant les paramètres de l' ^{125}I déjà enregistrés dans le logiciel de l'imageur SPECT/CT utilisé. L' ^{125}I est l'isotope utilisé en imagerie SPECT préclinique

avec l'énergie (27-31-36 keV) la proche de celle de l' ^{165}Er . Cette détection reste à être optimisée pour la bonne énergie et devra mener à des images encore plus nettes. Le constructeur de l'imageur nanoSPECT/CT (Mediso) travaille en collaboration avec le CIPA pour cette optimisation.

3.4. Complexation de l' $^{165}\text{Er(III)}$

Le ligand **L2** a été choisi pour la preuve de concept de la quantification *in vitro*. Ainsi, après ajustement du pH de la solution d' $^{165}\text{Er(III)}$ à 6,4, le complexe $^{165}\text{ErL2}$ a été préparé par réaction de $^{165}\text{Er(III)}$ avec **L2** dans un rapport métal : ligand (1 : 30) (**Schéma V.1**) à température ambiante. La cinétique de complexation a été suivie par chromatographie sur couche mince (MeOH/H₂O/acide acétique 4/4/0,2) (**Figure V. 7**). La formation totale du complexe $^{165}\text{ErL2}$ a été observée après 10 minutes de réaction.

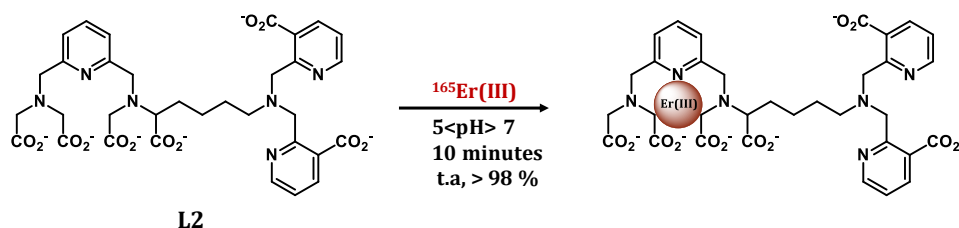


Schéma V. 1 : Formation des complexes $^{165}\text{ErL2}$.

L'avantage de la complexation de $^{165}\text{Er(III)}$ par un ligand linéaire est que la cinétique de complexation est rapide à température ambiante et à pH physiologique.

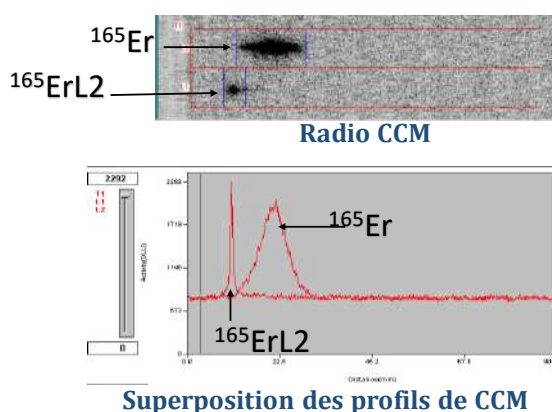


Figure V. 7 : Photographie de la plaque chromatographique sur couche mince dans un éluant (MeOH/H₂O/acide acétique 4/4/0,2) et les profils de $^{165}\text{ErL2}$ et $^{165}\text{Er(III)}$.

4. Principe et quantification du Zn(II)

4.1. Principe de la quantification

La **figure V. 8** illustre le principe de la détection quantitative de cation en général et du zinc en particulier. Dans un premier temps, il est donc essentiel de connaître la variation de $T_{1\rho}$ en fonction de la concentration en Zn(II) en IRM. Dans ce cadre, nous avons tracé la variation de la relaxivité en fonction de nombre d'équivalent de Zn(II) à concentration en **GdL2** constante (**Figure V. 9**). Ces mesures ont été effectuées à 20MHz et 298K. La variation observée est monotone et peut être modélisée par une droite, qui permet donc de quantifier le zinc.

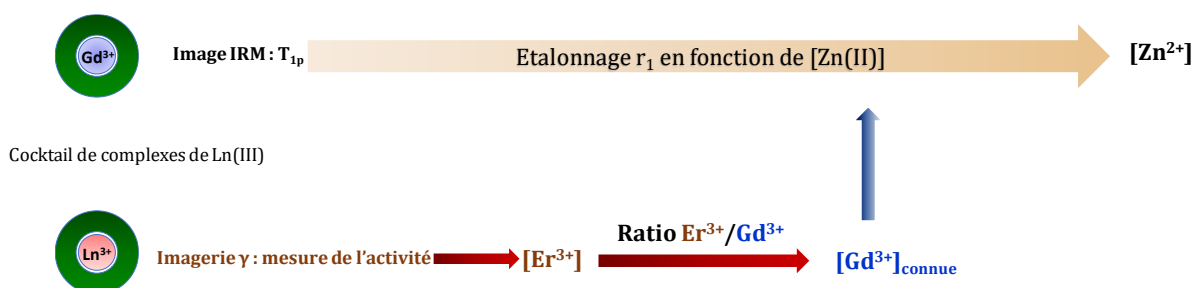


Figure V. 8 : Principe de la quantification de Zn(II) par couplage IRM- 2D γ caméra

L'activité de la sonde utilisée en imagerie γ permettra d'accéder à la concentration en agent radioactif. Connaissant le ratio $[^{165}ErL2]/[GdL2]$ du cocktail initial, il sera alors possible de connaître la concentration locale en **GdL2**. Finalement en utilisant la droite de calibration, il sera alors possible de déterminer la concentration inconnue en Zn(II).

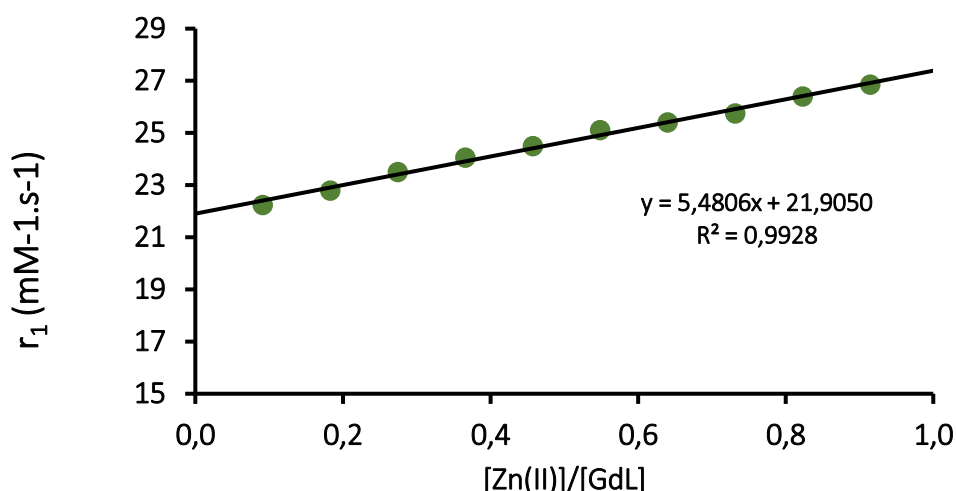


Figure V. 9 : Courbe d'étalonnage exprimant la variation de la relaxivité en fonction de nombre d'équivalent en Zn(II) pour le complexe [GdL2] = 0.5 mM, HEPES (0,1 M, pH 7,4), 20 MHz, 298 K en présence de la HSA à 0,6 mM.

4.2. Quantification du Zn(II)

Un complexe de **GdL2** a été préparé à température ambiante dans un tampon HEPES à pH = 7.4 par la réaction du ligand **L2** avec Gd(III) dans un rapport 1 : 1 (métal : ligand). Ensuite, un mélange de complexes **GdL2** et ¹⁶⁵ErL2 a été effectué dans un rapport connu ($1/2.4 \times 10^{-7}$). L'activité de l'¹⁶⁵Er a été mesurée grâce à la spectrométrie γ avec un détecteur Ge (Li). Les équations V. 1, V.2 et V.3 ont permis de remonter à la masse de ¹⁶⁵Er utilisée, et donc à sa concentration. C'est par ce raisonnement qu'il a été possible de connaître le rapport entre la concentration de **GdL2** et de ¹⁶⁵ErL2.

Cette solution mère a ensuite été diluée dans une solution de HSA (0,6 mM, concentration physiologique) en tampon HEPES. Afin de valider la méthode de quantification, des échantillons de concentrations variables en **GdL2** et contenant des concentrations « inconnues » de Zn(II) ont ensuite été préparées.

Tableau V. 3 : Données expérimentales et déterminées par les équations V. 1-3.

Echantillons	Activité mesurée (kBq)	Activité à t=0 (kBq)	T ₁ mesuré (ms)	[¹⁶⁵ Er(III)] calculée (mM)	[Gd (III)] calculée (mM)
1	108	378	126	7,20. 10 ⁻⁸	0,30
2	133	472	108	8,84. 10 ⁻⁸	0,37
3	159	547	87.2	1,06. 10 ⁻⁷	0,44
4	174	611	79.7	1,16. 10 ⁻⁷	0,48
5	189	617	83.8	1,26. 10 ⁻⁷	0,53

Les échantillons ont été imagés à l'aide d'une γ -caméra 2D (**Figure V. 10**) et les mesures de radioactivité par spectrométrie γ avec un détecteur Ge(Li) ont été effectuées pour chaque solution. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau V. 3**. Les concentrations en ¹⁶⁵Er ont donc pu être déterminées pour chaque solution, et les concentrations en Gd(III) ont été déduites grâce au ratio constant entre les deux Ln(III) (**Tableau V. 3**).

Ensuite, après la décroissance totale de l'¹⁶⁵Er présent dans ces échantillons, les images des échantillons ont été enregistrées sur un appareil IRM à 1,5 T et les valeurs de T₁ ont été déterminées (**Figure V. 10 et Tableau V. 3**). Cette dernière étape a été effectuée en collaboration avec Laurent Barantin de l'Université de Tours.

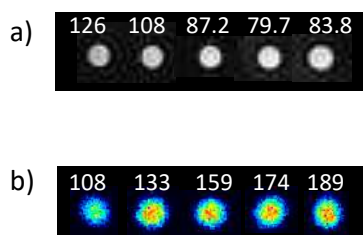


Figure V. 10 : a) Image IRM à 1,5 T et b) γ -image des échantillons

Comme la courbe d'étalonnage T_{1p} en fonction de la concentration en Zn(II) avait été effectuée à 20 MHz et à 298 K, nous avons effectué une nouvelle courbe d'étalonnage à $[GdL2] = 0,5$ mM et en présence d'HSA 0.6 mM au même moment que l'acquisition des échantillons, sous les mêmes conditions de champ magnétique (1.5T) et température (non contrôlée) (**Figure V. 11**).

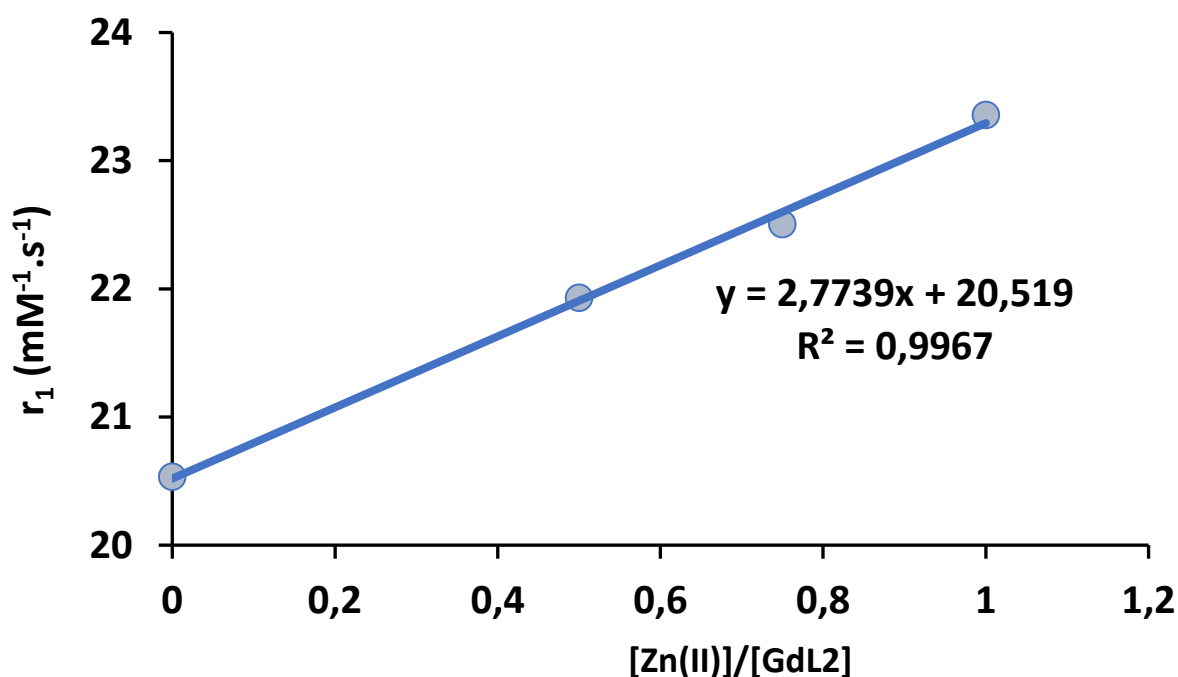


Figure V. 11 : Droite d'étalonnage pour la quantification de Zn(II), 1,5 T $[GdL2] = 0,3$ mM.

Les valeurs de T_1 des échantillons combinées à la concentration en Gd(III) préalablement déterminée ont permis de calculer les relaxivités pour chaque échantillon. Ces derniers ont été rapportés sur la nouvelle courbe d'étalonnage pour déterminer le nombre d'équivalent en Zn(II) présent dans la solution, puis sa concentration. Les résultats sont présentés dans le **tableau V.4**. La concentration expérimentale en Zn(II) correspond à celle déterminée par la méthode décrite ci-dessus, et la concentration théorique en Zn(II) des échantillons correspond celle déterminée par ICP.

Tableau V. 4 : Concentration de Zn(II) déterminée par l'utilisation de cocktail bimodal de LnL ($[Zn^{2+}]_{exp}$) et par ICP ($[Zn^{2+}]_{th}$).

Echantillon	$[Zn^{2+}]_{exp}$ (mM)	$[Zn^{2+}]_{th}$ (mM)	Error (%)
1	0.33	0.32	2.6
2	0.29	0.29	1.7
3	0.54	0.49	11.0
4	0.62	0.55	13.1
5	0.10	0.12	16.1

L'accord entre les valeurs théoriques et expérimentales est remarquable. En effet, les erreurs restent toujours inférieures à 16%. Cette méthode semble donc très prometteuse pour la quantification du Zn(II).

5. Conclusions et perspectives

A partir du ligand L2, nous avons apporté une preuve de concept de la détection quantitative du Zn(II). Notre approche est basée sur l'utilisation d'une sonde bimodale avec une réponse IRM dépendante de la concentration en Zn(II) et une réponse en SPECT dépendant uniquement de la concentration. Nous avons opté pour l'utilisation d'un Ln(III) radioactif, qui permet d'assurer une biodistribution la plus similaire possible entre le complexe de Gd(III) et de Ln(III) radioactif. L'originalité de la méthode

repose sur l'utilisation de ^{165}Er , qui présente un temps de demi-vie adapté et qui peut être purifié efficacement. Malgré sa très faible utilisation actuelle, l' ^{165}Er semble très prometteur pour la quantification du Zn(II) au vu des résultats obtenus. Cette technique peut bien entendu être utilisée pour la quantification de n'importe quel cation métallique, et plus généralement pour d'autres paramètres physiologiques comme le pH par exemple. L'utilisation de ^{165}Er peut également être étendue à l'étude de la biodistribution des complexes de Ln(III) en général.

Les perspectives de ce travail se situent dans la validation *in vivo* de la technique. Cela nécessite des développements métrologiques afin de connaître les atténuations d'activité obtenues *in vivo*. Ces développements sont actuellement en cours en collaboration avec le constructeur de l'imageur nanoSPECT/CT, Mediso.

6. Bibliographie

- [1] C. F. Ramogida and C. Orvig, "Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 42, p. 4720, 2013, doi: 10.1039/c3cc41554f.
- [2] R. J. Gillies, "In vivo molecular imaging," *J. Cell. Biochem.*, vol. 87, no. S39, pp. 231–238, 2002, doi: 10.1002/jcb.10450.
- [3] R. T. M. de Rosales, "Potential clinical applications of bimodal PET-MRI or SPECT-MRI agents: Bimodal PET/SPECT-MR Imaging Agents," *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 57, no. 4, pp. 298–303, Apr. 2014, doi: 10.1002/jlcr.3154.
- [4] E. Gianolio *et al.*, "Dual MRI-SPECT agent for pH-mapping," *Chem Commun*, vol. 47, no. 5, pp. 1539–1541, 2011, doi: 10.1039/C0CC03554H.
- [5] A. Kjaer and U. Knigge, "Use of radioactive substances in diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors," *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 50, no. 6, pp. 740–747, Jun. 2015, doi: 10.3109/00365521.2015.1033454.
- [6] E. W. Price and C. Orvig, "Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals," *Chem Soc Rev*, vol. 43, no. 1, pp. 260–290, 2014, doi: 10.1039/C3CS60304K.
- [7] A. Sigel and H. Sigel, Eds., *Metal complexes in tumor diagnosis and as anticancer agents*. New York: Marcel Dekker, 2004.
- [8] C. A. Hoefnagel, "Radionuclide cancer therapy," *Ann. Nucl. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 61–70, Apr. 1998, doi: 10.1007/BF03164831.
- [9] J. Carlsson, E. Forssell Aronsson, S.-O. Hietala, T. Stigbrand, and J. Tennvall, "Tumour therapy with radionuclides: assessment of progress and problems," *Radiother. Oncol.*, vol. 66, no. 2, pp. 107–117, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0167-8140(02)00374-2.
- [10] A. J. Amoroso, I. A. Fallis, and S. J. A. Pope, "Chelating agents for radiolanthanides: Applications to imaging and therapy," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 340, pp. 198–219, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.ccr.2017.01.010.
- [11] F. D. S. Butement, "Radioactive ^{165}Er ," *Proc. Phys. Soc. Sect. A*, vol. 63, no. 7, pp. 775–775, Jul. 1950, doi: 10.1088/0370-1298/63/7/111.
- [12] S. L. Mills, G. P. Basmadjian, and R. D. Ice, "Radiopharmaceuticals Used in Myocardial Imaging," *J. Pharm. Sci.*, vol. 70, no. 1, pp. 1–12, Jan. 1981, doi: 10.1002/jps.2600700102.
- [13] D. V. Rao, G. J. Hallee, M. E. Ottlinger, and K. S. R. Sastry, "Radiations emitted in the decay of ^{165}Er : A promising medical radionuclide," *Med. Phys.*, vol. 4, no. 3, pp. 177–186, May 1977, doi: 10.1118/1.594363.
- [14] G. W. Severin and K. M. Jensen, " ^{180}Y : A radionuclide generator of Erbium-165, an isotope for Auger Therapy," *Radiother. Oncol.*, vol. 110, pp. S88–S89, Feb. 2014, doi: 10.1016/S0167-8140(15)34201-8.
- [15] M. M. Khalil, J. L. Tremoleda, T. B. Bayomy, and W. Gsell, "Molecular SPECT Imaging: An Overview," *Int. J. Mol. Imaging*, vol. 2011, pp. 1–15, 2011, doi: 10.1155/2011/796025.
- [16] H. Thisgaard, S. Hvidsten, and P. Bollen, "SPECT imaging with the therapeutic Auger electron emitter ^{165}Er ," 2011.
- [17] J. E. Williams, "Donner Laboratory: The Birthplace of Nuclear Medicine," *J. Nucl. Med.*, vol. 40, no. 1, pp. 16N–20N, Jan. 1999.

Conclusions générale et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur le développement et la caractérisation d'une famille de sondes basée sur un motif pyridinique pour la complexation du Gd(III) et répondant à la présence du Zn(II), ainsi que sur la quantification *in vitro* du Zn(II). La principale application s'inscrit dans un contexte d'approche de diagnostic précoce, par IRM, pour laquelle la quantification du Zn(II) pourrait permettre la compréhension de son homéostasie et de son rôle dans différentes pathologies. Dans ce cadre, notre travail s'est axé sur trois points (1) l'optimisation de la stabilité des complexes de Ln(III) pour cette famille, (2) la rationalisation structure-réponse au Zn(II) des complexes de Gd(III) et (3) la preuve de concept de la détection quantitative *in vitro* du Zn(II).

Nous nous sommes donc focalisés sur des complexes comportant une unité pyridine pour la complexation des Ln(III). Ces complexes ont déjà été étudiés au laboratoire, en particulier pour des applications en IRM et imagerie optique. En effet, ils possèdent une bonne stabilité thermodynamique et cinétique et également, deux molécules d'eau en première sphère de coordination. De plus, ils ne forment pas des complexes ternaires avec les anions endogènes. Ce type de ligand a été modifié pour permettre la complexation du Zn(II). Une unité DPA (ou DPA modifiée) a été alors choisie car ce motif possède une bonne sélectivité et affinité pour le zinc. Nous avons ainsi développé 6 ligands (**L1**, **L2** et **L4-L7**) basés sur le ligand pyridinique, auquel nous avons ajouté, *via* un espaceur, une unité destinée à la complexation du zinc. Deux ligands modèles (**L3A** et **L3B**) ont également été conçus. Ces derniers ont pour but de mimer les parties ciblantes du Zn(II) des agents développés précédemment dans l'équipe et ceux développés au cours de cette thèse. Tous les ligands ont été obtenus avec des rendements corrects malgré les contraintes de cyclisation, de transamidation et de lactonisation observées pour les ligands **L1** et **L4**.

Grâce à l'ajout d'une fonction carboxylate dans la sphère de coordination du Ln(III), nous avons pu significativement augmenter la stabilité des complexes. En effet, les études potentiométriques sur les ligands **L1** et **L2**, ont montré qu'une augmentation de stabilité d'environ quatre ordres de grandeur a été apportée en remplaçant la fonction amide du ligand **L1** par un groupement carboxylate sur le ligand **L2**. Nous avons également démontré l'importance de la position des fonctions carboxylates sur l'unité DPA pour la détection du Zn(II). En effet dans les études précédemment réalisées au

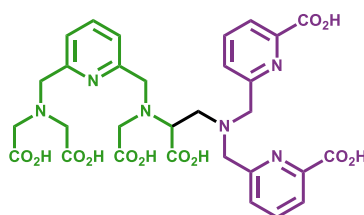
laboratoire, il a été montré que nous pouvions détecter le Zn(II) grâce à la formation d'espèces dimériques. Cependant cette détection n'était pas optimale pour une quantification puisque la variation de relaxivité en fonction du Zn(II) ajouté n'était pas monotone. Au cours de ce travail, nous avons montré qu'en variant la position des fonctions carboxylates sur l'unité DPA nous pouvions diminuer très fortement la formation de dimères. Ceci a également été démontré par des études potentiométriques sur les composés modèles **L3A** et **L3B** mimant les motifs complexants du Zn(II). Pour la totalité des complexes développés, nous n'avons pas obtenu de variations importantes (Δq de l'ordre de 2) du nombre d'hydratation du Gd(III) par ajout de Zn(II), et ce malgré des calculs DFT dans le cas d'une structure. Ceci montre toute la difficulté de la conception de complexes pour la détection de cations métalliques dont la réponse va dépendre à la fois de la partie complexante du Gd(III), de l'espaceur, et de la partie complexante du cation ciblé.

Ceci a été démontré dans le chapitre 4 dans lequel nous avons vu que des changements minimes de structure influençaient très fortement la réponse au Zn(II). En effet, entre **Gd25**, précédemment développé au laboratoire, et **GdL7**, la seule différence est l'ajout d'une fonction carboxylate dans la sphère de coordination du Gd(III). Or en absence de Zn(II), le complexe **Gd25** est non hydraté et présente une relaxivité purement de type sphère externe. Au contraire, le complexe **GdL7** est présent sous un mélange de forme non hydratée et bishydratée, avec une très forte majorité de forme bishydratée comme en témoigne la relaxivité élevée de ce complexe ($11,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 298 K). Ceci signifie que l'introduction de la fonction carboxylate, nécessaire à la stabilité du complexe de Gd(III) en présence de Zn(II), a modifié la sphère de coordination du Gd(III). Par conséquent, l'approche de l'unité DPA modifiée et le remplacement des deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination du Gd(III) en absence de Zn(II) deviennent très difficile. Ceci peut être dû à des contraintes stériques ou/et électrostatique puisque la charge autour du Gd(III) passe de 0 à -1 par ajout de cette fonction carboxylate.

La comparaison des réponses à la présence du Zn(II) de **GdL6** et **GdL7**, qui diffèrent par la position des fonctions carboxylates sur l'unité DPA, est également très instructive. En effet, une augmentation de la relaxivité a été observée par ajout de Zn(II) pour le complexe **GdL7**. Cela est en accord avec la variation du nombre d'hydratation de Gd(III)

observée. Au contraire, une diminution de la relaxivité a été observée pour le complexe **GdL6** par ajout de Zn(II). Cela est en contradiction avec l'augmentation de q observée. Cette diminution peut s'expliquer par la position des fonctions carboxylates sur l'unité DPA qui favoriseraient une contribution de seconde sphère importante à la relaxivité et/ou une vitesse d'échange importante en absence de Zn(II). En présence de Zn(II), en raison de contraintes électrostatiques, ces fonctions carboxylates s'éloignent du Gd(III), ce qui se traduit par une diminution de la relaxivité. Des expériences complémentaires de mesure de vitesse d'échange, et détermination de q moyen en solution par RMN de ^{17}O sont prévues afin de valider cette hypothèse. Même si la réponse au Zn(II) n'est pas optimale, il n'en reste pas moins que ce complexe est très intéressant puisqu'il présente une sélectivité inégalée pour le Zn(II) par rapport au Cu(II).

Un troisième ligand **L8** avec un positionnement différent des carboxylates sur la DPA a également été obtenu récemment (voir structure ci-dessous) et il sera très intéressant d'analyser le comportement du complexe correspondant vis-à-vis du Zn(II) pour aboutir encore à une meilleure compréhension structure/réponse de cette famille de complexes.

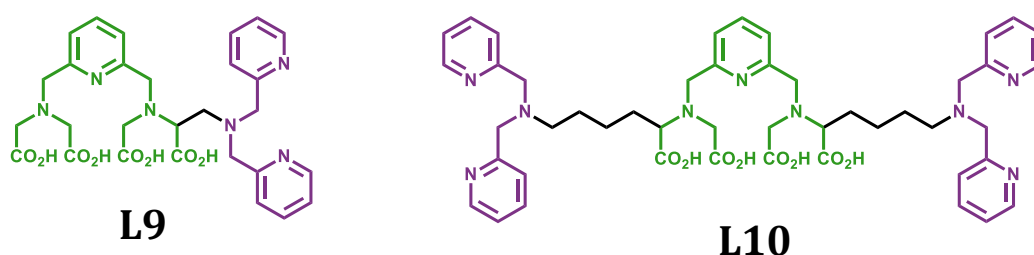


L8

Structure du ligand L8

Les complexes **GdL2**, **GdL4** et **GdL5**, qui possèdent des espaceurs plus longs, ne répondent pas de façon significative au Zn(II). L'espaceur donne sans doute trop de flexibilité pour obtenir des variations significatives de la sphère de coordination du Gd(III) par ajout de Zn(II). Par contre, tous ces complexes répondent de façon significative au Zn(II) en présence de HSA par variation de temps de corrélation rotationnel τ_R . Par des études relaxométriques de détermination de constante d'affinité, nous avons montré que l'introduction de cations divalents augmentait l'affinité des complexes pour la HSA, sans doute par coordination directe des cations par la HSA.

Nous avons également réalisé une étude structurale complète montrant comment, par modification de l'unité complexante du Zn(II) et de l'espaceur, nous pouvions optimiser la réponse de ces complexes. Nous avons ainsi montré que la présence de fonctions carboxylates sur la DPA augmente l'affinité du complexe pour la HSA en absence de Zn(II) et la diminue en sa présence. La réponse au Zn(II) est donc exaltée lorsque l'unité DPA seule est utilisée pour la reconnaissance du Zn(II). La sélectivité vis-à-vis du Cu(II) s'améliore également. Comme la rigidité du système joue un rôle prépondérant dans l'amplitude de la réponse au Zn(II), nous envisageons d'optimiser la réponse au Zn(II) en présence de HSA sur ces systèmes par deux voies différentes : soit diminuer la longueur du linker (**L9**), soit introduire deux unités complexantes du Zn(II) afin de « verrouiller » le système (**L10**) (voir ci-dessous). La synthèse de **L10** est déjà bien avancée et la synthèse de **L9** ne devrait pas poser de problèmes particuliers, puisqu'il sera obtenu de manière similaire à **L6-L8**.



Structures des ligands L9, L10

Enfin, l'introduction d'une fonction amide au sein de l'espaceur a permis d'obtenir le complexe **GdL4** qui est très sélectif pour le Cu(II) vis-à-vis du Zn(II). Ce résultat était assez inattendu mais il est très intéressant puisqu'une très bonne sélectivité au Cu(II), en particulier vis-à-vis du Zn(II), reste très difficile à obtenir. Nous envisageons des expériences supplémentaires de détermination de site d'interaction, ainsi que de potentiométrie, afin de déterminer précisément l'origine de cette sélectivité.

Enfin, au vu de la réponse au Zn(II) monotone en présence de la HSA obtenue avec le complexe **GdL2**, nous avons apporté une preuve de concept sur la quantification *in vitro* de Zn(II).

Notre approche est basée sur l'utilisation d'une sonde bimodale avec une réponse IRM dépendante de la concentration en Zn(II) et une réponse en imagerie nucléaire (TEMP) dépendante uniquement de la concentration en sonde. Nous avons opté pour l'utilisation d'un Ln(III) radioactif, qui permet d'assurer une biodistribution la plus similaire possible entre le complexe de Gd(III) et de Ln(III) radioactif. L'originalité de la méthode repose sur l'utilisation de $^{165}\text{Er(III)}$, qui présente un temps de demi-vie adapté à l'imagerie et qui peut être produit et purifié efficacement. Nous avons pu montrer que nous parvenions à quantifier le Zn(II) avec des précisions tout à fait acceptables. Malgré sa très faible utilisation actuelle, l' $^{165}\text{Er(III)}$ semble très prometteur pour la quantification du Zn(II) au vu des résultats obtenus. Cette technique peut bien entendu être utilisée pour la quantification de n'importe quel cation métallique, et plus généralement pour d'autres paramètres physiologiques. L'utilisation de $^{165}\text{Er(III)}$ peut également être étendue à l'étude de la biodistribution des complexes de Ln(III) en général.

Dans le futur, nous envisageons de valider cette quantification *in vivo*. Des étapes de développements métrologiques seront toutefois nécessaires afin d'optimiser la reconstruction des images TEMP obtenues avec ce radiolanthanide. Ces développements sont actuellement en cours, en collaboration avec le constructeur de l'imageur nanoSPECT/CT, Mediso.

Une fois ces développements validés, il sera nécessaire de développer une palette de sondes présentant des affinités différentes pour le Zn(II) en fonction de la cible visée. Pour cela, toutes les études structurales de compréhension et de rationalisation que nous avons effectuées au cours de ce travail vont grandement nous guider afin d'aboutir efficacement à des sondes d'affinité variées.

Partie Expérimentale

Ce chapitre présente le matériel, les méthodes et techniques utilisés pour mener à bien les travaux de ce manuscrit. Un mode opératoire détaillé accompagné d'une analyse complète de chaque nouvelle molécule sont fournis. Afin de rendre cette partie accessible à un plus grand nombre et pour faciliter toute reproduction de manipulation, ce chapitre sera rédigé en anglais.

The experiment aspect of this work will be presented in this chapter. In order to facilitate a better understanding of a large number of readers, this chapter will be written in English. We describe the experimental procedures and the techniques we use for organic compounds and metallic complexes characterization.

Experimental procedures and materials

➤ Solvents and reagents

All commercial reagents and solvents come from different suppliers such as Alfa-Aeser, CheMatech, Fisher Scientific, Sigma-Aldrich and TCI Chemicals and were used without further purifications. The solvents used for reactions were either anhydrous or kept under molecular sieve.

➤ Analysis methods and characterizations

Purification

Reactions were monitoring by thin layer chromatography (TLC) plates provided by Merck, aluminium sheets cover with silica gel 60 F254. The TLCs were revealed under the appropriate conditions.

- Under ultraviolet lamp at 254 nm
- With ninhydrin for amines
- With a potassium permanganate solution for oxidizable compounds
- With dragendorff for alkaloids

Purifications were performed on a SPOT II flash chromatography.

NMR Spectroscopy

^1H and ^{13}C and complementary experiments (COSY, HSQC and HMBC) NMR spectra were recorded on a Bruker Advance III HD Spectrometer using a 5 mm BBFO probe. ^1H and ^{13}C were obtained respectively at 600 MHz and 150 MHz. Chemical shifts are reported in δ (ppm) and coupling constants (J) are given in Hertz (Hz). The multiplicity of signal are given for the ^1H NMR spectra (s: singulet, d: doublet, t: triplet, q: quadruplet and m: multiplet, bs: broad signal, p: pseudo).

Mass spectrometry

High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) spectra were performed by Dr. Cyril Colas using an electron spray ionization (ESI) technique at the Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) as part of the Research Federation (FR 2708) with the Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) in Orléans.

Liquid sample preparation

Ln(III) solutions were prepared in MilliQ water and their concentration were determined by complexometric titration in urotropine buffer (pH 5.6-5.8) with a standardized EDTA solution using xylene orange as indicator. The purity of the ligands were assessed by adding an excess of Zn(II) followed by complexometric titration of the non-complexed Zn(II) in solution with EDTA.

The Gd(III) complexes were prepared by using mixing stoichiometric amounts of the GdCl₃ with each ligand in HEPES (0.1 M pH = 7.4). Free Gd(III) was tested by xylene orange indicator. The concentration of Gd(III)-containing solutions were also checked both by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma) and BMS (Bulk Magnetic Susceptibility) measurements when possible. Zn(II), Cu(II), Ca(II) and Mg(II) were also used as chloride salt. Zn(II) and Cu(II) solutions were titrated as previously described and concentrations were checked by ICP-MS measurements. Ca(II) and Mg(II) solutions were titrated as previously described.

HSA was used in its fatty-acid free form.

Potentiometric studies

Carbonate-free 0.1 M KOH and 0.1 M HCl were prepared from Fisher Chemicals concentrates. All potentiometric titrations were performed in 0.1 M aqueous KCl under nitrogen atmosphere, the temperature was controlled to 25 ± 0.1 °C with a circulating water bath. The p[H] ($p[H] = -\log[H^+]$, concentration in molarity) was measured in each titration with a combined pH glass electrode (Metrohm) filled with 3 M KCl and the titrant addition was automated by use of a 702 SM titrino (Metrohm). The electrode was calibrated in hydrogen ion concentration by titration of HCl with KOH in 0.1 mol.L⁻¹

electrolyte solution. A plot of meter reading versus $p[H]$ allows the determination of the electrode standard potential (E°) and the slope factor (f). Continuous potentiometric titrations were conducted on 3 mL of aqueous solution containing the ligand **L1** (2.90 mM) and 5 mL of aqueous solutions containing the ligands **L2** (3.18 mM), **L3A** (1.97 mM) and **L3B** (2.00 mM) in KCl 0.1 M, with 2 minutes waiting between 2 points to determine protonation constants. The titrations of the metal complexes were performed on 3 mL of **L1** (2.90 mM) and 5 mL solutions of **L2** (3.18 mM), **L3A** (1.97 mM) and **L3B** (2.00 mM) containing 1 or 2 equivalent of metal cation, with 2 minutes waiting between 2 points. At least 2 titrations curves were collected for each potentiometric study. Titrations were performed in 1.8 - 12 pH range or until metal hydroxide precipitation occurred (in the samples with metal excess). Extra volume of HCl was added to the starting solution to obtain a pH starting value of 1.8.

Experimental data were refined using the computer program Hyperquad 2008 [1]. All equilibrium constants are concentration quotients rather than activities. The ionic product of water at 25 °C and 0.1 M ionic strength is $pK_w = 13.77$ [2]. Fixed values were used for pK_w , and total concentrations of metal, ligand and acid.

UV-Vis absorption spectra

For the stability studies of the [**CuL1**, **Cu₂L1**] ($C_{L1} = 2.5$ mM), [**CuL2**, **Cu₂L2**] ($C_{L2} = 1.56$ mM) and [**CuL3B**] ($C_{L3B} = 3$ mM) complexes, UV-Vis absorption spectra were recorded on a V 670 JASCO Uv-Vis/NIR Spectrophotometer in the range of $\lambda = 350 - 875$ nm at 293 K and the samples in solutions are analyzed in 1 cm quartz cells. Out-off-cell samples were prepared containing complex solution, 1 M KCl, and different HCl concentration.

Relaxometric studies

Proton NMRD measurements of **GdL1** and **GdL2** were performed on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow.

For complexes **GdL4**, **GdL5**, **GdL6** and **GdL7** proton NMRD measurements were performed in Ecole Polytechnique de Lausanne (Laboratory of Dr Lothar Helm) on the minispec BRUKER “mqvar” (20, 30, 40 and 60 MHz). Relaxivity at 100 MHz, 400 MHz and 600 MHz were measured on a Bruker Advance 100, 400 and 600 MHz spectrometer respectively.

Luminescence studies

Luminescence spectra were recorded on an Agilent Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer.

Emission spectra were collected in the range of $\lambda = 550 - 750$ nm at 293 K, following the excitation of the pyridine moiety at 263 nm using PMT Detector voltage High. The samples in solutions are analyzed in 1 cm quartz cells. Solution of **EuL1**, **EuL2**, **EuL5**, **EuL6** and **EuL7** were prepared in 0.1 M HEPES buffer (pH = 7.4).

The luminescence lifetime of the europium complexes were obtained by recording the decay of the emission intensity at 615 nm, following the excitation of the pyridine moiety at 263 nm. Measurements were performed in both H₂O and D₂O solutions in buffer (HEPES 0.1 M) at pH/pD of 7.4. The settings were as follows: gate time: 0.050 ms; delay time: 0.100 ms; total decay time: 6.000 ms; 100 cycles. At least ten decay curves were collected for each sample; the lifetimes were analyzed as monoexponential and biexponential decays when needed.

Production, purification and radiolabeling:

¹⁶⁵Er ($T_{1/2} = 10.36$ h) was prepared from irradiation of natural foil of ¹⁶⁵Ho by proton beam (16MeV) on a particle accelerator cyclotron at CEMHTI. ¹⁶⁵Ho has an isotopic abundance of 100%. ¹⁶⁵Er is produced from the reaction ¹⁶⁵Ho(p,n)¹⁶⁵Er with a specific activity of 500 KBq/(μ A.h.mg) at end of beam (16 MeV, 2 μ A, 2h); and decays by EC to the stable isotope ¹⁶⁵Ho.

Then, ¹⁶⁵Er is separated from ^{nat/166}Ho foil by ion-exchange chromatography using a 2-ethylhexylphosphoric mono 2-ethylhexyl ester LN2 resin (Triskem, Bruz, France) and a

gradient of HNO_3 as eluent. The ^{165}Er is eluted with 1M HNO_3 , and the fractions containing ^{165}Er are evaporated to dryness and re-dissolved in a minimum volume of 1M HNO_3 . The pH was adjusted between 5-7 with NaOH. A 1:30 $^{165}\text{Er}^{3+}$: L was used. The mixture is incubated for 10 min at room temperature and the radiochemical purity of the labeling was followed by thin-layer chromatography (silica plates), using Water/Methanol/Acetic Acid (4:4:0.2) as mobile phase. The TLCs are exposed by impregnation on a multisensitive phosphor screen (Packard, Perkin Elmer, Meriden, USA, and revealed on a Cyclone Storage phosphor system Packard, Perkin Elmer, Shelton, USA). In this system, the free ^{165}Er migrates ($R_f = 0.4$) and the ^{165}ErL has a R_f of 0.1.

Activated samples are diluted and put in a tube. Activity measurements were assessed by γ -ray spectrometry with HPGe detector. For the data acquisition the samples were placed at a distance of around 5 cm from the crystal. HPGe detector is calibrated in energy and efficiency for different geometries with certified standard radioactive sources (Cerca France). For activity measurement, γ -ray spectrum analysis software package Genie 2000 (Canberra, USA), was used.

Gamma-camera Imaging:

Scintigraphic imaging was performed with a high-resolution gamma camera (Biospace Mesures, Paris, France) equipped with a position-sensitive photomultiplier tube and a parallel collimator (20mm thickness) with 1.7-mm holes. Images were recorded with a 128x128-pixel and 16-bit matrix, on the photopeaks of the ^{165}Er .

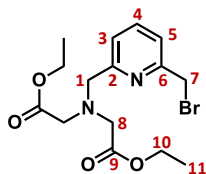
MRI Phantoms:

MRI images of phantoms were recorded in Tours (Université François Rabelais) by Dr. Laurent Barantin on a GE MRI 1.5 T SIGNA magnet. A birdcage coil (8 elements) was used both for emission and reception. A T_1 -weighted spin-echo sequence was used with a $TE = 9$ ms and a variable TR (20-2000 ms).

➤ Synthesis part

Diethyl 2,2'-(((6-(bromomethyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate :

Compound 1



Formula : C₁₅H₂₁BrN₂O₄

Molecular weight : M= 373.24 g.mol⁻¹

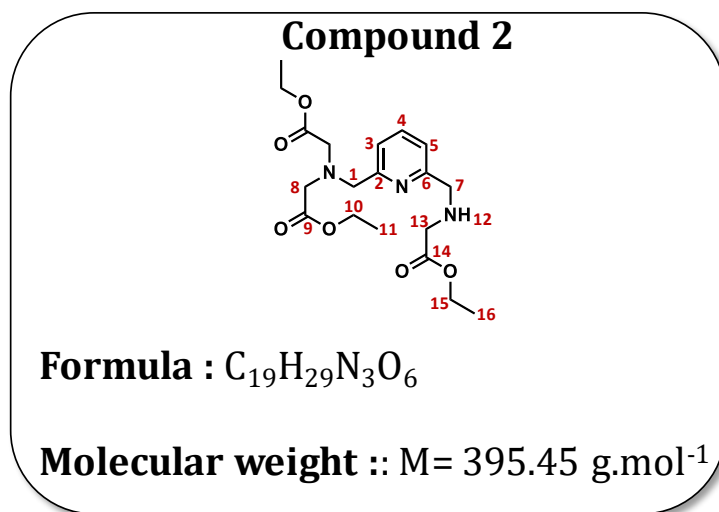
To a solution of 2,6-bis(bromomethyl)pyridine (5.0 g, 19.02 mmol) in acetonitrile (200 mL) were added potassium carbonate (2.2 g, 15.92 mmol) and diethyl iminodiacetate (1.2 g, 6.34 mmol) dropwise over a period of 1 h. The mixture was refluxed for an additional 3h. The residue was filtered and the solvent was evaporated. The product **1** was obtained after purification by flash chromatography on silica gel (Dichloromethane: Ethyl Acetate 6:4) as a yellow oil (2.06 g). **Yield: 87 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.68 (pt, ³J = 7.8 Hz, 1H₄); 7.56 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₃); 7.34 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₅); 4.53 (s, 2H₇); 4.16 (q, ³J = 7.2 Hz, 4H₁₀); 4.07 (s, 2H₁); 3.63 (s, 4H₈); 1.25 (t, ³J = 7.2 Hz, 6H₁₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.7 (C₉); 158.8 (C₂); 155.7 (C₆); 137.3 (C₄); 121.9 (C₃); 121.6 (C₅); 60.1 (C₁₀); 59.4 (C₁); 54.4 (C₈); 33.7 (C₇); 13.9 (C₁₁).

HRMS: calc. for C₁₅H₂₁BrN₂O₄ [M+H]⁺ 373.0685 ; found 373.0789 (⁷⁹Br) and 375.0769 (⁸¹Br).

Diethyl 2,2'-(((6-(((2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate :



To a solution of glycine ethyl ester hydrochloride (3.21 g, 22.8 mmol) in acetonitrile (300 mL) were added potassium carbonate (5.4 g, 39.1 mmol), sodium iodide (0.7 g, 4.67 mmol) and a solution of compound **1** (1.7 g, 4.5 mmol) in acetonitrile (50 mL) dropwise over a period of 1 h. The reaction mixture was refluxed for an additional 2 h and, after cooling down to room temperature, the mixture was hydrolyzed with water (80 mL). The organic solvent was evaporated and the residue was extracted with dichloromethane (4 x 20 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$ and the solvent was evaporated. The product **2** was obtained after a purification by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate: Methanol 98:2). 1.273 g of brown oil was obtained. **Yield: 71 %**

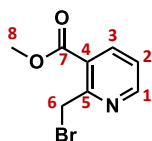
1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.64 (t, $^3J = 7.8$ Hz, $1H_4$); 7.48 (d, $^3J = 7.8$ Hz, $1H_5$); 7.21 (d, $^3J = 7.8$ Hz, $1H_3$); 4.17 (m, $6H_{10,15}$); 4.06 (s, $2H_7$); 3.92 (s, $2H_1$); 3.61 (s, $4H_8$); 3.47 (s, $2H_{13}$); 2.58 (bs, $1H_{12}$); 1.26 (m, $9H_{11,16}$).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 172.0 (C_{14}); 171.0 (C_9); 158.4 (C_6); 158.3 (C_2); 137.0 (C_4); 121.1 (C_5); 120.4 (C_3); 60.5 (C_1); 60.3 (C_{10}); 59.8 (C_{15}); 54.4 (C_8); 54.3 (C_6); 50.3 (C_{13}); 14.1 ($C_{11,16}$).

HRMS: calc. for $C_{19}H_{29}N_3O_6$ $[M+H]^+$ 396.2056; found 396.2125

Methyl 2-(bromomethyl)nicotinate

Compound 3



Formula : $C_8H_8BrNO_2$

Molecular weight : $M = 230.05 \text{ g.mol}^{-1}$

A mixture of methyl-2-methylnicotinate (2.00 g, 13.2 mmol), N-bromosuccinimide (3.08 g, 17.3 mmol) and AIBN (0.200 g, 1.22 mmol) in chloroform (120 mL) was heated to reflux with vigorous stirring. After 22 h, the reaction mixture was cooled to room temperature and the solvent was then evaporated under vacuum. The residue was dissolved in ethyl acetate (10 mL) and the resulting solution was washed with water (40 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried over $MgSO_4$, and concentrated under vacuum. Purification of the residue by flash chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 :Ethyl Acetate 93:7) gave compound **3** (1.275 g) as a colorless crystals. **Yield : 42 %**

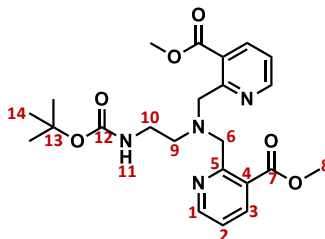
1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.42 (d, $^3J = 3.3$ Hz, H_1); 7.99 (d, $^3J = 6.6$ Hz, H_3); 7.09 (dd, $^3J = 6.6$ Hz, $^3J = 3.3$ Hz, $1H_2$); 4.77 (s, H_6); 3.68 (s, H_8).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 165.3 (C_7); 157.3 (C_5); 152.04 (C_1); 139.1 (C_3); 124.8 (C_4); 123.1 (C_2); 52.5 (C_8); 32.4 (C_6).

HRMS: calc. for $C_8H_8BrNO_2$ $[M+H]^+$ 229.9738; found 229.9811 (^{79}Br) et 231.9791 (^{81}Br).

Dimethyl 2,2'-(((2-((tert-butoxycarbonyl) amino)ethyl)azanediyl)bis(methylene)) dinicotinate :

Compound 4



Formula : $C_{23}H_{30}N_4O_6$

Molecular weight : $M = 458.50 \text{ g.mol}^{-1}$

To a solution of the compound **3** (714 mg, 3.1 mmol) in acetonitrile was added N-Boc-ethylenediamine (249 mg, 1.55 mmol) and K_2CO_3 (536 mg, 3.88 mmol). The mixture was refluxed for 3h. The reaction mixture was cooled to room temperature. Water (20 mL) was added and acetonitrile was evaporated under vacuum. The product was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL) then dried over $MgSO_4$, and concentrated in vacuum. Purification of the residue by flash chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 : Ethyl Acetate 20:80) gave compound **4** (415 mg) as a colorless oil. **Yield: 58 %**

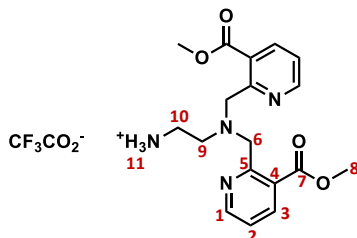
1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.49 (d, $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, 2H₁); 7.88 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H₃); 7.10 (dd, $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H₂); 6.36 (bs, 1H₁₁); 4.17 (s, 4H₆); 3.77 (s, 6H₈); 2.05 (t, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, 2H₁₀); 2.65 (t, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, 2H₉); 1.34 (s, 9H₁₄).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163.9 (C7); 158.9 (C12); 152.1 (C1); 145.9 (C5); 145.8 (C3); 127.6 (C4); 125.7 (C2); 78.4 (C13); 55.1 (C6); 52.9 (C8); 51.7 (C9); 35.1 (C10); 28.1 (C14).

HRMS: calc. for $C_{23}H_{30}N_4O_6$ $[M+H]^+$ 459.2165 ; found 459.2246

2-(bis((3-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl) methyl)amino)ethanaminium 2,2,2-trifluoroacetate

Compound 5



Formula: C₁₈H₂₂N₄O₄ · C₂HF₃O₂

Molecular weight : M= 472.41 g.mol⁻¹

To a solution of compound **4** (413 mg, 0.901 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added trifluoroacetic acid (5 mL) and the mixture was stirred for 1 h. The solvent and the excess of trifluoroacetic acid were evaporated. Compound **5** as yellow oil was obtained (425.6 mg). **Yield:** quantitative

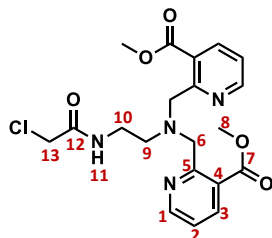
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.26 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2H₁); 8.23 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2H₃); 7.34 (pt, ³J = 8.8 Hz, 2H₂); 4.19 (s, 4H₆); 3.32 (s, 6H₈); 2.28 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H₁₀); 2.72 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H₉).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 163.9 (C7); 152.1 (C1); 145.9 (C5); 145.8 (C3); 127.6 (C4); 125.7 (C2); 55.1 (C6); 52.9 (C8); 51.7 (C9); 35.1 (C10).

HRMS: calc. for C₁₈H₂₂N₄O₄ [M+H]⁺ 359.1641 ; found 359,7188

Dimethyl 2,2'-(((2-(2-chloroacetamido) ethyl) azanediyl)bis (methylene)) di nicotinate :

Compound 6



Formula : $C_{20}H_{23}ClN_4O_5$

Molecular weight : $M = 434.87 \text{ g.mol}^{-1}$

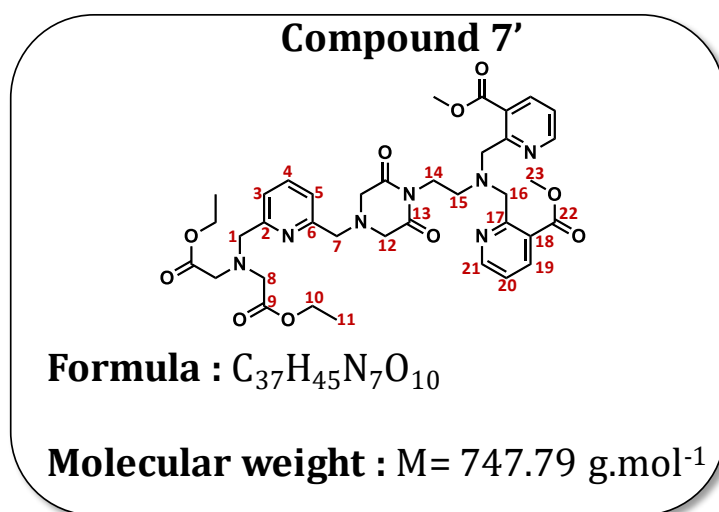
To a solution of compound **5** (425 mg, 0.901 mmol) in THF (10 mL), was added chloroacetyl chloride (0.29 mL, 3.604 mmol) and triethylamine (1.22 mL, 9.01 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2h30. The reaction was quenched with water and the solvent was evaporated. The residue was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL) then dried over $MgSO_4$ and filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate) to give compound **6** (314 mg) as a colorless oil. **Yield: 80 %**

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8,63 (d, $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, 2H₁); 8,05 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H₃); 7,99 (bs, 1H₁₁); 7,24 (dd, $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H₂); 4,32 (s, 4H₆); 3,98 (s, 2H₁₃); 3,88 (s, 6H₈); 3,20 (t, $^3J = 5,4 \text{ Hz}$, 2H₁₀); 2,79 (t, $^3J = 5,4 \text{ Hz}$, 2H₉).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 167.0 (C₁₂); 166.6 (C₇); 160.0 (C₅); 151.1 (C₁); 138.3 (C₃); 126.6 (C₄); 121.8 (C₂); 59.7 (C₆); 53.4 (C₁₀); 52.3 (C₈); 42.6 (C₁₃); 38.4 (C₉).

HRMS: calc. for $C_{20}H_{23}ClN_4O_5$ $[M+H]^+$ 435.1357 ; found 435.1098

Dimethyl 2,2'-(((2-(4-((6-((bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)-2,6-dioxopiperazin-1-yl)ethyl)azanediyl)bis (methylene))dinicotinate:



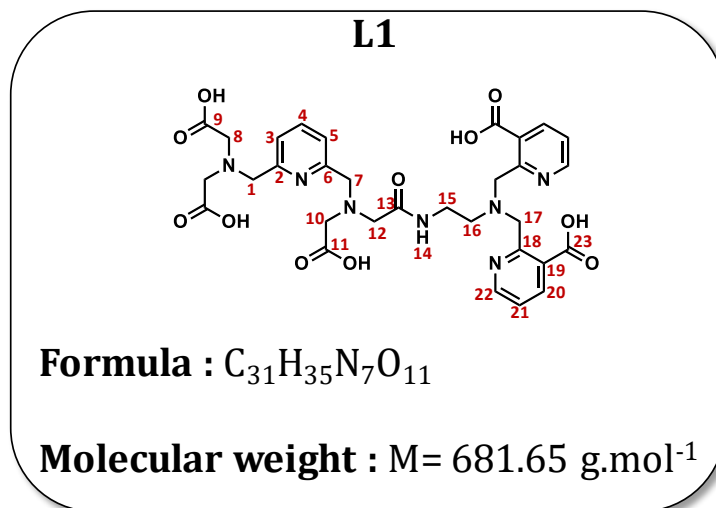
To a solution of compound **6** (0.383 g, 0.68 mmol) in acetonitrile (15 mL) were added compound **2** (0.380 g, 1.65 mmol) and potassium carbonate (0.518 g, 3.75 mmol) and, the mixture was refluxed for 3 days. After being cooled down at room temperature, water (20 mL) was added and the solvent was evaporated. The residue was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL) and the organic phase was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate: MeOH 95:5 with 1 % NEt₃) to obtain the pure product (0.212g). **Yield : 42 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.58 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H₂₁); 7.99 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H₁₉); 7.66 (pt, ³J = 8.1 Hz, 1H₄); 5.56 (d, ³J = 7.8 Hz 1H₃); 7.21 (pd, ³J = 8.4 Hz, 2H₂₀); 7.20 (d, ³J = 8.4 Hz, 1H₅); 4.36 (s, 4H₁₆); 4.17 (q, ³J = 6.9 Hz, 4H₁₀); 4.05 (s, 2H₁); 3.87 (s, 6H₂₃); 3.77 (t, ³J = 6,9 Hz, 2H₁₄); 3.71 (s, 2H₇); 3.60 (s, 4H₁₂); 3.40 (s, 4H₈); 2,72 (t, ³J = 6,9 Hz, 2H₁₅); 1.26 (t, ³J = 7.2 Hz, 6H₁₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.1 (C₉); 169.8 (C₂₂); 167.5 (C₁₃); 159.1 (C₁₇); 155.3 (C₂₁); 150.7 (C₂ et 6); 137.8 (C₁₈); 137.4 (C₄); 127.2 (C₁₉); 121.8 (C₂₀); 121.6 (C₃ et 5); 62.0 (C₁); 60.5 (C₁₆); 60.0 (C₇); 58.3 (C₁₀); 56.4 (C₈); 54.9 (C₁₂); 52.3 (C₂₃); 36.9 (C₁₄); 29.7 (C₁₅); 14.2 (C₁₁).

HRMS: calc. for C₃₇H₄₅N₇O₁₀ [M+H]⁺ 748.3228; found 748.3293.

2,2'-(((2-(2-(((6-((bis(carboxymethyl)amino methyl)pyridin-2-yl)methyl)(carboxymethyl)amino)acetamido)ethyl)azanediyl)bis(methylene))dinicotinic acid :



To a solution of compound **8** (0.210 g, 0.281 mmol) in a mixture of THF:H₂O (1:1 v:v, 20 mL) was added lithium hydroxide (0.222 g, 5.29 mmol) and the solution was stirred for 1 day at room temperature. The solvent was evaporated and the crude product was obtained after purification on C18 phase (MeOH: H₂O 1:1 with 0.1 % TFA) as a white solid (0.191 g). **Yield: 100 %**

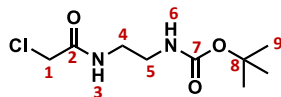
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.39 (dd, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, 2H₂₂); 8.24 (dd, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, 2H₂₀); 8.00 (pt, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₄); 7.54 (dd, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, $^4J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H₃, 1H₅); 7.38 (dd, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, 2H₂₁); 4.93 (s, 4H₁₇); 4.59 (s, 2H₁); 4.55 (s, 2H₇); 4.24 (s, 2H₁₂); 3.97 (s, 2H₁₀); 3.95 (s, 4H₈); 3.73 (t, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, 2H₁₅); 3.65 (t, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, 2H₁₆).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.9 (C₁₁); 170.7 (C₉ et C₂₃); 168.7 (C₁₃); 168.6 (C₁₉); 150.8 (C₁₈); 150.6 (C₆); 150.3 (C₂₂); 149.8 (C₂); 141.5 (C₂₀); 141.2 (C₄); 125.4 (C₃ et 5); 124.7 (C₂₁); 58.8 (C₁₇); 58.1 (C₁); 57.4 (C₇); 56.6 (C₁₀); 55.7 (C₈); 55.5 (C₁₂); 55.0 (C₁₆); 34.1 (C₁₅).

HRMS: calc. for $C_{31}H_{35}N_7O_{11}$ $[M+H]^+$ 682.2395; found 682.2459.

Tert-butyl (2-(2-chloroacetamido)ethyl) carbamate :

Compound 8



Formula : C₉H₁₇ClN₂O₃

Molecular weight : M= 236.69 g.mol⁻¹

To a solution of N-Boc-ethylene diamine (2 mL, 12.6 mmol) in acetonitrile (80 mL) were added chloroacetyl chloride (3.01 mL, 37.9 mmol) and potassium carbonate (5.230 g, 37.9 mmol). The reaction was stirred for one hour at room temperature and the mixture was quenched with water (40 mL) and stirred 30 minutes. The solvent was evaporated and the residue was extracted with dichloromethane (3x50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated. The crude production was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate). 2.380 g of a white powder was obtained. **Yield: 80 %**

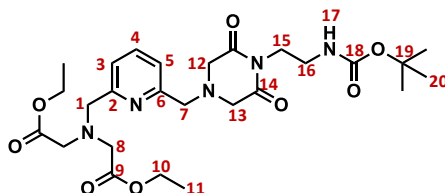
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.21 (s, 1H₆); 4.90 (bs, 1H₃); 4.04 (s, 2H₁); 3.42 (dt, ³J = 5.4 Hz, ³J = 6.8 Hz, 2H₄); 3.33 (dt, ³J = 5.7 Hz, ³J = 6.8 Hz, 2H₅); 1.45 (s, 9H₉).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 167.0 (C₂); 157.0 (C₇); 80.1 (C₈); 42.7 (C₁); 41.4 (C₅); 39.9 (C₄); 28.5 (C₉).

Data were identical to those reported in literature [3].

Diethyl 2,2'-(((6-((4-(2-((tert-butoxycarbonyl) amino) ethyl) -3,5-dioxopi perazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl) methyl) azanediyl)diacetate :

Compound 9'



Formula : C₂₆H₃₉N₅O₈

Molecular weight : M= 549.61 g.mol⁻¹

A mixture of compound **2** (0.572 g, 1.45 mmol), compound **8** (0.68 g, 2.89 mmol), potassium carbonate (0.700 g, 5.06 mmol) and sodium iodide (0.442 g, 2.95 mmol) in acetonitrile (15 mL) was refluxed for 20 h. After being cooled down to room temperature, the mixture was filtered and the solvent was evaporated. The crude production was purified by flash chromatography on silica gel (Dichloromethane: Ethyl Acetate 8:2). 0.693 g of brown oil was obtained. **Yield: 87 %**

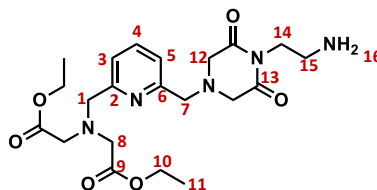
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.68 (pt, ³J = 7.8 Hz, 1H₄); 7.58 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₃); 7.24 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₅); 5.00 (bs, 1H₁₇); 4.17 (q, ³J = 7.2 Hz, 4H₁₀); 4.06 (s, 2H₁); 3.89 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H₁₅); 3.77 (s, 2H₇); 3.61 (s, 4H₈); 3.49 (s, 2H₁₂ et 2H₁₃); 3.33 (dt, ³J = 6.5 Hz, ³J = 5.1 Hz, 2H₁₆); 1.40 (s, 9H₂₀); 1.26 (t, ³J = 7.2 Hz, 6H₁₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.7 (C₉); 169.8 (C₁₄); 158.9 (C₁₈); 155.9 (C₂); 155.1 (C₆); 121.6 (C₃); 121.0 (C₅); 78.4 (C₁₉); 60.1 (C₁₀); 60.0 (C₁); 59.9 (C₇); 59.6 (C₈); 54.5 (C₁₂); 54.5 (C₁₃); 38.7 (C₁₅); 38.4 (C₁₆); 28.1 (C₂₀); 13.9 (C₁₁).

HRMS: calc. for C₂₆H₃₉N₅O₈ [M+H]⁺ 550.2799; found 550.2878

Diethyl 2,2'-(((6-((4-(2-aminoethyl)-3,5-dioxopiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:

Compound 10'



Formula : C₂₁H₂₁N₅O₆

Molecular weight : M= 449.50 g.mol⁻¹

To a solution of compound **9'** (0.570 g, 1.04 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added trifluoroacetic acid (5 mL) and the mixture was stirred for 1 h. The solvent and the excess of trifluoroacetic acid were evaporated. The residue was dissolved in dichloromethane and washed with a saturated solution of NaHCO₃ (pH = 8). The organic phase was dried over MgSO₄, solid was filtered and the solvent was evaporated to give a yellow oil (467.5 mg). **Yield: 100 %**

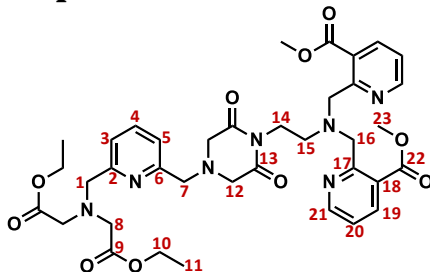
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.26 (s, 2H₁₆); 7.74 (pt, ³J = 7.2 Hz, 1H₄); 7.39 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H₅); 7.27 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H₃); 4.17 (q, ³J = 5.4 Hz, 4H₁₀); 4.06 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H₁₄); 3.99 (s, 2H₇); 3.78 (s, 2H₁); 3.48 (bs, 4H₈ and 4H₁₂); 3.23 (t, ³J = 5.4 Hz, 2H₁₅); 1.22 (t, ³J = 7.2 Hz, 6H₁₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.7 (C₉); 169.8 (C₁₃); 155.9 (C₂); 155.1 (C₆); 121.6 (C₃); 121.0 (C₅); 60.1 (C₁₀); 60.0 (C₁); 59.9 (C₇); 59.6 (C₈); 54.5 (C₁₂); 38.7 (C₁₄); 38.4 (C₁₅); 13.9 (C₁₁).

HRMS: calc. for C₂₁H₂₁N₅O₆ [M+H]⁺ 450.2274; found 450.2873

Dimethyl 2,2'-(((2-(4-((6-((bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)-2,6-dioxopiperazin-1-yl)ethyl) azanediyl)bis(methylene))dinicotinate:

Compound 7' second method



Formula : $C_{37}H_{45}N_7O_{10}$

Molecular weight : $M = 747.79 \text{ g.mol}^{-1}$

This compound (295.5 g) was synthesized following the same procedure as for compound **4**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate: MeOH 95:5 with 1 % NEt_3). **Yield: 38 %**

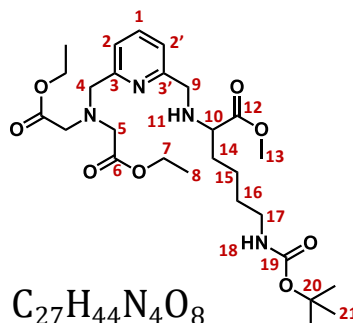
1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.58 (d, $^3J = 7.8$ Hz, $2H_{21}$); 7.99 (d, $^3J = 7.8$ Hz, $2H_{19}$); 7.66 (pt, $^3J = 8.1$ Hz, $1H_4$); 5.56 (d, $^3J = 7.8$ Hz $1H_3$); 7.21 (pd, $^3J = 8.4$ Hz, $2H_{20}$); 7.20 (d, $^3J = 8.4$ Hz, $1H_5$); 4.36 (s, $4H_{16}$); 4.17 (q, $^3J = 6.9$ Hz, $4H_{10}$); 4.05 (s, $2H_1$); 3.87 (s, $6H_{23}$); 3.77 (t, $^3J = 6.9$ Hz, $2H_{14}$); 3.71 (s, $2H_7$); 3.60 (s, $4H_{12}$); 3.40 (s, $4H_8$); 2.72 (t, $^3J = 6.9$ Hz, $2H_{15}$); 1.26 (t, $^3J = 7.2$ Hz, $6H_{11}$).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 171.1 (C9); 169.8 (C22); 167.5 (C13); 159.1 (C17); 155.3 (C21); 150.7 (C2 et 6); 137.8 (C18); 137.4 (C4); 127.2 (C19); 121.8 (C20); 121.6 (C3 et 5); 62.0 (C1); 60.5 (C16); 60.0 (C7); 58.3 (C10); 56.4 (C8); 54.9 (C12); 52.3 (C23); 36.9 (C14); 29.7 (C15); 14.2 (C11).

HRMS: calc. for $C_{37}H_{45}N_7O_{10}$ $[M+H]^+$ 748.3228; found 748.3293.

Diethyl 2,2'-(((6-(((6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-methoxy-1-oxohexan-2-yl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyldiacetate:

Compound 11



Formula : $C_{27}H_{44}N_4O_8$

Molecular weight : $M = 552.66 \text{ g.mol}^{-1}$

A solution of compound **1** (419.2 mg, 1.12 mmol) in acetonitrile (30 mL) was added dropwise over a period of 1h to a mixture of N ϵ -Boc-L-lysine methyl ester hydrochloride (1g, 3.37 mmol) and di-isopropylethylamine (1.45g, 11.23 mmol) in acetonitrile (70 mL). The mixture was refluxed for 18h. The solvent was evaporated, and the product **11** was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate, 1% triethylamine) and obtained as a yellow oil (438 mg). **Yield: 71 %**

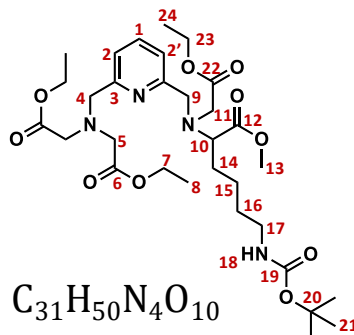
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.63 (pt, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_1); 7.46 (d, $^3J = 7.6\text{Hz}$, 1H_2); 7.21 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $1\text{H}_{2'}$); 4.81 (s, 1H_{18}); 4.17 (q, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 4H_7); 4.04 (s, 2H_4); 3.96 (d, $^2J = 15.4 \text{ Hz}$, 1H_{9a}); 3.84 (d, $^2J = 15.4 \text{ Hz}$, 1H_{9b}); 3.70 (s, 3H_{13}); 3.61 (s, 4H_5); 3.31 (t, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 1H_{10}); 3.10 (m, 2H_{17}); 2.30 (bs, 1H_{11}); 1.70 (m, 2H_{14}); 1.48 (m, 2H_{16}); 1.42 (s, 9H_{21}); 1.40 (m, 2H_{15}); 1.26 (t, $^3J = 7.2$, 6H_8).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 175.4 (C_{12}); 171.0 (C_6); 158.5 ($\text{C}_{3'}$); 158.3 (C_3); 155.8 (C_{19}); 136.9 (C_1); 121.0 (C_2); 120.3 ($\text{C}_{2'}$); 78.7 (C_{20}); 60.8 (C_{10}); 60.3 (C_7); 59.8 (C_4); 54.7 (C_5); 53.2 (C_9); 51.6 (C_{13}); 40.2 (C_{17}); 32.9 (C_{14}); 29.7 (C_{16}); 28.3 (C_{21}); 22.9 (C_{15}); 14.1 (C_8).

HRMS: calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 553.3159 ; found 553.3233

Diethyl 2,2'-(((6-(((6-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-methoxy-1-oxo hexan-2-yl)(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino) methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl) diacetate:

Compound 12



Formula : $C_{31}H_{50}N_4O_{10}$

Molecular weight : $M = 638.75 \text{ g.mol}^{-1}$

A mixture of compound **11** (436 mg, 0.79 mmol), ethyl bromoacetate (171.3 mg, 1.03 mmol) and di-isopropylethylamine (816 mg, 6.31 mmol) in acetonitrile (10 mL) was refluxed for 23h. The solvent was evaporated, and product **12** was isolated by flash chromatography on silica gel (Dichloromethane: Ethyl Acetate 1:1 + 1% Triethylamine) as a yellow oil (430 mg). **Yield: 85 %**

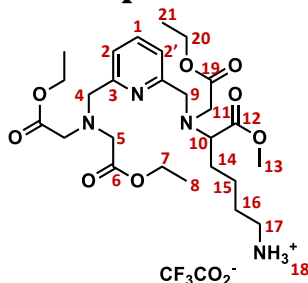
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.66 (t, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_1); 7.52 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_2); 7.45 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $1\text{H}_{2'}$); 4.73 (s, 1H_{18}); 4.17 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 4H_7); 4.12 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H_{23}); 4.03 (s, 2H_4); 3.97 (d, $^2J = 15.5 \text{ Hz}$, 1H_{9a}); 3.84 (d, $^2J = 15.5 \text{ Hz}$, 1H_{9b}); 3.70 (s, 3H_{13}); 3.61 (s, 4H_5); 3.53 (d, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, 1H_{11a}); 3.24 (d, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, 1H_{11b}); 3.43 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H_{10}); 3.09 (m, 2H_{17}); 1.73 (m, 2H_{14}); 1.45 (m, 2H_{16} ; 2H_{15}); 1.43 (s, 9H_{21}); 1.26 (t, $^3J = 7.1$, 6H_8); 1.24 (t, $^3J = 7.1$, 3H_{24}).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173.4 (C_{12}); 171.5 (C_{22}); 171.1 (C_6); 159.0 ($\text{C}_{3'}$); 158.0 (C_3); 155.9 (C_{19}); 137.1 (C_1); 121.1 (C_2); 120.9 ($\text{C}_{2'}$); 78.8 (C_{20}); 63.4 (C_{10}); 60.4 (C_7 , C_{23}); 59.8 (C_4); 57.6 (C_9); 54.8 (C_5); 52.5 (C_{11}); 51.3 (C_{13}); 40.2 (C_{17}); 29.7 (C_{14}); 29.4 (C_{15}); 28.3 (C_{21}); 23.2 (C_{16}); 14.1 (C_8 , C_{24}).

HRMS: calc. for $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 639.3527 ; found 639.3599

Diethyl 2,2'-(((6-(((6-amino-1-methoxy-1-oxohexan-2-yl)(2-ethoxy-2-oxoethyl) amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl) azanediyl) diacetate:

Compound 13



Formula: $C_{26}H_{42}N_4O_8 \cdot C_2HF_3O_2$

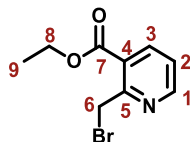
Molecular weight : $M = 652.65 \text{ g.mol}^{-1}$

To a solution of compound 12 (0.428 g, 0.67 mmol) in dichloromethane (5 mL) was added trifluoroacetic acid (5 mL) and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent and the excess of trifluoroacetic acid were evaporated to give yellow oil (437 mg). **Yield: 100 %**

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 8.41 (t, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_1); 7.89 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_2); 7.84 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_2); 6.09 (s, 3H_{18}); 4.17 (d, $^2J = 17.1 \text{ Hz}$, 1H_{9a} , 1H_{9b}); 4.43 (s, 2H_4); 4.13 (m, 4H_7 , 2H_{20}); 3.75 (s, 4H_5); 3.72 (s, 3H_{13}); 3.70 (s, 2H_{11}); 3.57 (t, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H_{10}); 2.91 (t, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H_{17}); 1.80 (m, 2H_{14}); 1.65 (m, 2H_{16}); 1.45 (m, 2H_{15}); 1.22 (m, 6H_8 , 3H_{21}).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 173.0 (C_{12}); 172.3 (C_{19}); 171.5 (C_6); 154.3 (C_3 , C_3'); 145.9 (C_1); 124.2 (C_2); 124.0 (C_2'); 64.8 (C_{10}); 60.9 (C_{20}); 60.8 (C_7); 55.5 (C_5); 55.1 (C_4); 53.3 (C_9); 52.9 (C_{11}); 51.0 (C_{13}); 39.0 (C_{17}); 29.4 (C_{14}); 26.8 (C_{16}); 22.9 (C_{15}); 13.0 (C_8); 13.0 (C_{21}).

HRMS: calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539.3003 ; found 539.3077

Ethyl 2-(bromomethyl)nicotinate:**Compound 14****Formula:** $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{BrNO}_2$ **Molecular weight:** $244.08 \text{ g.mol}^{-1}$

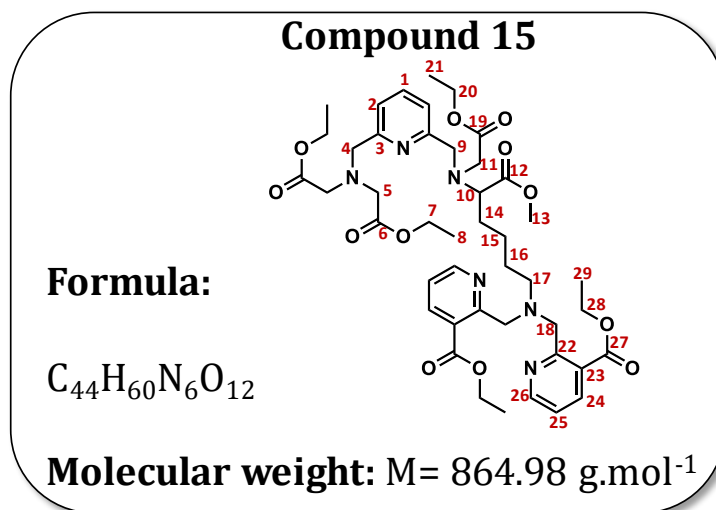
A mixture of Ethyl-2-methylnicotinate (2.00 g, 14.6 mmol), N-bromosuccinimide (3.08 g, 17.3 mmol) and AIBN (0.200 g, 1.22 mmol) in chloroform (120 mL) was heated to reflux with vigorous stirring. After 22h, the reaction mixture was cooled to room temperature and the solvent was then evaporated under vacuum. The residue was dissolved in ethyl acetate (10 mL) and the resulting solution was washed with water (40 mL) and brine (20 mL), dried over MgSO_4 , and concentrated under vacuum. Purification of the residue by flash chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 : Ethyl Acetate 93:7) gave compound **3** as a colorless crystals, (1,461 g). **Yield: 41 %**

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.56 (dd, $^3J = 5.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H₁); 8.15 (dd, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H₃); 7.22 (dd, $^3J = 5.0 \text{ Hz}$, $^3J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H₂); 4.91 (s, 2H₆); 4.31 (q, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H₈); 1.30 (t, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 3H₉).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 165.1 (C7); 157.5 (C5); 152.0 (C1); 139.0 (C3); 125.3 (C4); 123.0 (C2); 61.7 (C8); 32.5 (C6); 14.0 (C9).

HRMS: calc. for $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{BrN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 243.9895; 244.9928; 245.9874; found 243.3862. 244.2659; 245.2486

Diethyl 2,2'-(((5-(((6-((bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)-6-methoxy-6-oxohexyl)azanediyl)bis(methylene))dinicotinate:



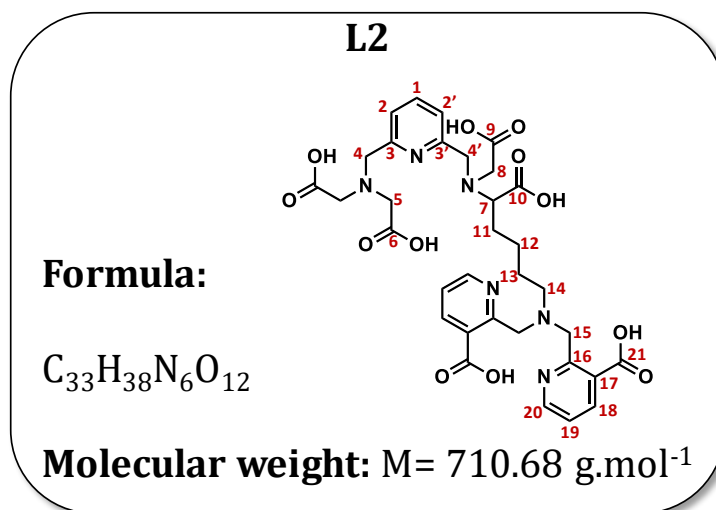
A mixture of compound **13** (0.67 mmol), ethyl 2-(bromomethyl)nicotinate (687 mg, 2.8 mmol), sodium iodide (200 mg, 1.34 mmol) and DIEA (1.3 g, 10.05 mmol) was refluxed for 23h. The solids were filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate, 1% triethylamine) and compound **15** was obtained as a yellow oil (438 mg). **Yield: 76 %**

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.57 (d, $^3J = 3.7$ Hz, 2H_{26}); 7.96 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H_{24}); 7.63 (pt, $^3J = 7.6$ Hz, 1H_1); 7.45 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H_2); 7.40 (d, $^3J = 7.7$ Hz, $1\text{H}_{2'}$); 7.19 (pt, $^3J = 5.8$ Hz, 2H_{25}); 4.29 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 4H_{28}); 4.24 (bs, 4H_{18}); 4.15 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 4H_7); 4.09 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 2H_{20}); 4.01 (s, 2H_4); 3.98 (d, $^2J = 15.6$ Hz, 1H_{9a}); 3.88 (d, $^2J = 15.6$ Hz, 1H_{9b}); 3.6 (s, 3H_{13}); 3.59 (s, 4H_5); 3.51 (d, $^2J = 14.8$ Hz, 1H_{11a}); 3.46 (d, $^2J = 14.8$ Hz, 1H_{11b}); 3.35 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 1H_{10}); 2.50 (s, 2H_{17}); 1.58 (m, 2H_{14}); 1.39 (m, 2H_{16}); 1.35 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 6H_{29}); 1.25 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 6H_8); 1.21 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H_{21}); 1.17 (bs, 2H_{15}).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 175.8 (C_{12}); 171.6 (C_{19}); 169.3 (C_6); 165.0 (C_{27}); 158.2 (C_{23}); 157.1 (C_{22}); 155.9 (C_3 , $\text{C}_{3'}$); 148.5 (C_{26}); 135.6 (C_{24}); 135.3 (C_1); 125.7 (C_{25}); 119.5 (C_2); 119.4 ($\text{C}_{2'}$); 62.0 (C_{10}); 59.3 (C_{28}); 58.6 (C_7); 58.5 (C_{20}); 58.0 (C_4); 56.2 (C_{18}); 55.9 (C_9); 53.0 (C_5); 51.7 (C_{17}); 50.5 (C_{11}); 49.4 (C_{13}); 27.7 (C_{14}); 24.3 (C_{16}); 22.1 (C_{15}); 12.3 (C_{29}); 12.2 (C_8); 12.2 (C_{21}).

HRMS: calc. for $C_{44}H_{60}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 865.4269 ; found 865.4340

2,2'-(((5-(((6-((bis(carboxymethyl)amino) methyl)pyridin-2-yl)methyl) (carboxymethyl)amino)-5-carboxypentyl) azanediyl)bis (methylene))dinicotinic acid:



To a solution of compound **15** (0.210 g, 0.281 mmol) in a mixture of THF: H₂O (1:1 v:v, 20 mL), was added lithium hydroxide (0.222 g, 5.29 mmol) and the solution was stirred for 1 day at room temperature. The solvent was evaporated and the ligand **L2** was obtained, after a purification on C18 phase (MeOH: H₂O 1:1 with 0.1 % TFA), as a white solid (0.172 g). **Yield: 90 %**

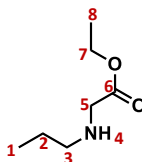
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.43 (d, $^3J = 4.8 \text{ Hz}$, 2H₂₀); 8.14 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H₁₈); 8.01 (t, $^3J = 6.1 \text{ Hz}$, 1H₁); 7.53 (d, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, 1H₂ and 1H_{2'}); 7.35 (dd, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 5.01 Hz, 2H₁₉); 4.82 (s, 4H₁₅); 4.51 (bs, 2H₄, 2H_{4'}); 3.92 (s, 4H₅); 3.85 (pd, $^2J = 15.0 \text{ Hz}$, 1H_{8a} and 1H_{8a'}); 3.83-3.78 (m, 2H₁₄ and 1H₇); 3.42 (t, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 2H₁₄); 1.87 (m, 2H₁₁); 1.82 (m, 2H₁₃); 1.57 (m, 2H₁₂).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 172.9 (C₁₀); 171.5 (C₉); 170.7 (C₆); 168.3 (C₂₁); 151.2 (C₁₇); 151.0 (C₃); 150.5 (C_{3'}); 149.7 (C₁₆); 142.3 (C₁); 140.6 (C₁₈); 127.2 (C₁₉); 124.8 (C₂, C_{2'}); 66.2 (C₇); 58.3 (C₄, C_{4'}); 57.2 (C₁₅); 56.5 (C₁₄); 55.5 (C₅); 53.5 (C₈); 27.1 (C₁₁); 22.9 (C₁₃); 21.4 (C₁₂).

HRMS: calc. for $C_{33}H_{38}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 711.2548 ; found 711.2619

Ethyl 2-(propylamino)acetate

Compound 16



Formula: C₇H₁₅NO₂

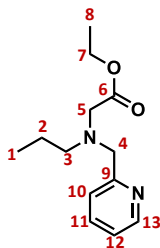
Molecular weight: 145,19 g.mol⁻¹

To a solution of the propylamine (2.65g, 44.8 mmol) in chloroform (10 mL), ethyl bromoacetate (700 mg, 4.07 mmol) was added dropwise. After 2 h, the solution was concentrated to dryness to remove volatiles species. The residue was extracted with diethyl ether and dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated to give ethyl 2-(propylamino) acetate (455.01 mg). **Yield: 77 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4.11 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H₇); 3.31 (s, 2H₅); 2.50 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H₃); 1.57 (bs, 1H₄); 1.43 (m, 2H₂); 1.20 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H₈); 0.85 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.3 (C₆); 60.3 (C₇); 51.2 (C₃); 50.7 (C₅); 22.9 (C₂); 14.0 (C₈); 11.4 (C₁).

HRMS: calc. for C₇H₁₅NO₂ [M+H]⁺ 146.1103 ; found 146.1178.

Ethyl 2-(propyl(pyridine-2-ylmethyl)amino)acetate:**Compound 17****Formula:** $C_{13}H_{20}N_2O_2$ **Molecular weight:** 236,31 g.mol⁻¹

A mixture of compound 16 (454 mg, 3.13 mmol), 2-(chloromethyl)pyridine hydrochloride (2.11 g, 12.5 mmol) and potassium carbonate (5.21g, 37.5 mmol) in acetonitrile (20 mL) was refluxed for 2 days. After being cooled down to room temperature, the solids were removed and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl acetate) to give compound 17 (436 mg). **Yield: 59 %**

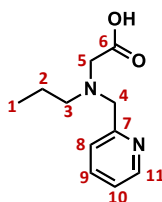
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.45 (d, $^3J = 4.5$ Hz, 1H₁₃); 7.58 (pt, $^3J = 7.7$ Hz, 1H₁₁); 7.46 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H₁₀); 7.07 (pt, $^3J = 6.2$ Hz, 1H₁₂); 4.09 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 2H₇); 3.86 (s, 2H₅); 3.32 (s, 2H₄); 2.55 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 2H₃); 1.43 (m, 2H₂); 1.19 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3H₈); 0.80 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.5 (C₆); 159.8 (C₉); 148.9 (C₁₃); 136.4 (C₁₁); 122.9 (C₁₂); 121.9 (C₁₀); 60.3 (C₇); 60.2 (C₅); 56.3 (C₃); 55.0 (C₄); 20.7 (C₂); 14.2 (C₈); 11.6 (C₁).

HRMS: calc. for $C_{13}H_{20}N_2O_2$ [M+H]⁺ 237.1525 ; found 237.1595.

2-(propyl(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetic acid:

L3A



Formula: $C_{11}H_{16}N_2O_2$

Molecular weight: 208.25 g.mol⁻¹

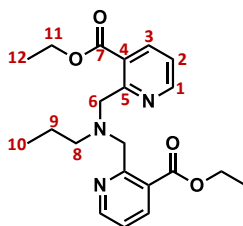
To a solution of compound 17 (441 mg, 1.87 mmol) in mixture of THF:H₂O (1:1, v:v, 10mL) was added lithium hydroxide monohydrate (235 mg, 5.60 mmol) and the solution was stirred for 6 h at room temperature. The solvent were evaporated and the crude product was purified on C18 (H₂O: MeOH, 9: 1, HCl) to obtain L3A (365 mg).

Yield: 80 %

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.67 (d, 3J = 5.0 Hz, 1H₁₁); 8.07 (t, 3J = 7.6 Hz, 1H₉); 7.70 (d, 3J = 7.6 Hz, 1H₈); 7.63 (t, 3J = 6.7 Hz, 1H₁₀); 4.61 (s, 2H₅); 3.90 (s, 2H₄); 2.55 (t, 3J = 7.4 Hz, 2H₃); 1.78 (m, 2H₂); 0.95 (t, 3J = 7.4 Hz, 3H₁).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 169.8 (C6); 148.4 (C7); 148.1 (C11); 140.1 (C9); 126.1 (C10); 125.5 (C8); 57.8 (C5); 57.1 (C3); 55.2 (C4); 17.2 (C2); 9.9 (C1).

HRMS: calc. for C₁₁H₁₆N₂O₂ [M+H]⁺ 209.1212 ; found 209.1284.

Diethyl 2,2'((propylazanediyl)bis (methylene))dinicotinate:**Compound 18****Formula:** $C_{21}H_{27}N_3O_4$ **Molecular weight:** 385.45 g.mol⁻¹

Ethyl 2-(bromomethyl)nicotinate (0.700 g, 2.87 mmol) and propylamine (0.709 g, 1.2 mmol) were dissolved in acetonitrile (15 mL) and stirred with K_2CO_3 (1.689g, 12 mmol). The resulting mixture was refluxed for 3 days yielding a red-brown slurry. The slurry was filtered and the solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl acetate) (371 mg). **Yield: 80 %**

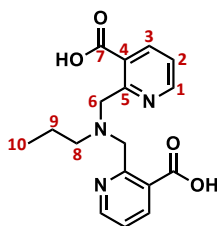
1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.53 (dd, $^3J = 4.9$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 2H₁); 7.91 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 2H₃); 7.15 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, 4.8 Hz, 2H₂); 4.27 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 4H₁₁); 4.23 (s, 4H₆); 2.41 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2H₈); 1.35 (m, 2H₉); 1.32 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 6H₁₂); 0.64 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H₁₀).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 167.0 (C7); 160.2 (C5); 150.3 (C1); 137.3 (C3); 127.7 (C4); 121.3 (C2); 61.1 (C11); 58.2 (C6); 55.7 (C8); 19.7 (C9); 14.1 (C12); 11.6 (C10).

HRMS: calc. for $C_{21}H_{27}N_3O_4$ $[M+H]^+$ 386.2002; found 386.1595

2,2'((propylazanediy)bis(methylene)) dinicotinic acid:

L3B



Formula: C₁₇H₁₉N₃O₄

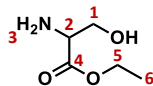
Molecular weight: 329.35 g.mol⁻¹

This compound was synthesized following the same procedure as for compound **L3A** (297.2 mg). **Yield: 94 %**

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.50 (dd, ³J = 5.0 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2H₁); 8.25 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 2H₃); 7.43 (dd, ³J = 8.1 Hz, 5.0 Hz, 2H₂); 4.90 (s; 4H₆); 3.44 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H₈); 1.85 (m, 2H₉); 0.95 (t, ³J = 7.5 Hz, 3H₁₀).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 168.2 (C₇); 151.2 (C₁); 149.8 (C₅); 140.9 (C₃); 127.0 (C₄); 125.0 (C₂); 58.9 (C₈); 58.2 (C₆); 17.5 (C₉); 10.129 (C₁₀).

HRMS: calc. for C₂₁H₂₇N₃O₄ [M+H]⁺ 330.1376; found 330.4283

Ethyl 2-amino-3-hydroxypropanoate:**Compound 19****Formula:** $C_5H_{11}NO_3$ **Molecular weight:** $M = 133.15 \text{ g.mol}^{-1}$

H-Ser-OH (5.10 g, 48.53 mmol) was dissolved in EtOH (200 mL). The solution was cooled on ice and $SOCl_2$ (18 mL, 246.80 mmol) was added dropwise. After the addition was complete, the reaction mixture was stirred 1 h at 0°C followed by 23 h at room temperature. Then, the reaction mixture was concentrated to an oil, which was triturated with ice-cold diethyl ether to give ethyl ester **19** as a white solid (6.33 g).

Yield: 98 %

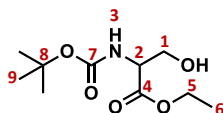
^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 4.42-4.28 (m, $2H_3$ and $2H_5$); 4.15 (dd, $^3J = 4.5 \text{ Hz}$, $^3J = 3.5 \text{ Hz}$, $1H_2$); 4.04 (dd, $^2J = 11.8$, $^3J = 4.5 \text{ Hz}$, $1H_{1a}$); 3.97 (dd, $^2J = 11.8$, $^3J = 3.5 \text{ Hz}$, $1H_{1b}$); 1.36 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, $3H_6$).

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 168.9 (C_4); 63.7 (C_5); 60.7 (C_1); 56.1 (C_2); 14.3 (C_6)

HRMS: calc. for $C_5H_{11}NO_3$ $[M+H]^+$ 134.0739; found 134.1404

Ethyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanoate [4]:

Compound 20



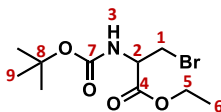
Formula: C₁₀H₁₉NO₅

Molecular weight: M = 233.26 g.mol⁻¹

The compound **19** (0.5 g, 3.76 mmol) was stirred with di-tert-butyl dicarbonate (0.90 g, 4.14 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (0.92 g, 7.52 mmol) in DMF (20 mL) at room temperature for 2 h. After removal of the solvent, the residue was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed successively with aqueous NaHSO₄ and brine, dried over MgSO₄, and concentrated. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate = 50/50) to afford to the compound **20** (570 mg). **Yield: 65 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.53 (bs, 1H₃); 4.29 (m, 1H_{1a}); 4.14 (q, ³J = 8.0 Hz, 2H₅); 3.79-3.90 (m, 1H_{1b}); 3.21 (m, 1H₂); 1.39 (s, 9H₉); 1.25 (t, ³J = 8.0 Hz, 3H₁).

HRMS: calc. for C₁₀H₁₉NO₅ [M+H]⁺ 234.1263 ; found 234.1109

Ethyl 3-bromo-2-((tert-butoxycarbonyl) amino)propanoate:**Compound 21****Formula:** $C_{10}H_{18}BrNO_4$ **Molecular weight:** $M = 295.16 \text{ g mol}^{-1}$

A solution of triphenylphosphine (713 mg, 2.72 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added to a suspension of NBS (381 mg, 2.14 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL). The mixture was stirred 10 min before compound **20** (500 mg, 2.14 mmol) was added. The dark brown solution was stirred for 22 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated and then subjected to column chromatography on silica gel (cyclohexane: ethyl acetate 1:1) to obtain compound **21** (304 mg). **Yield: 48 %**

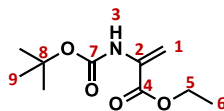
1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 5.40 (d, $^3J = 7.2$ Hz, $1H_3$); 4.65 (m, $1H_{1a}$); 4.19 (q, $^3J = 7.8$ Hz, $2H_5$); 3.75- 3.65 (m, $1H_{1b}$); 1.39 (s, $9H_9$); 1.24 (t, $^3J = 7.8$ Hz, $3H_6$).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 168.1 (C3); 154.0 (C7); 79.4 (C8); 61.2 (C5); 52.9 (C1); 33.2 (C2); 27.7 (C9); 13.2 (C6).

HRMS: calc. for $C_{10}H_{18}BrNO_4$ $[M+H]^+$ 296.0419; 297.0453; 298.0399; found 296.0491; 297.0519; 298.0472.

Ethyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino) acrylate:

Compound 22'



Formula: C₁₀H₁₇NO₄

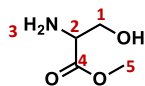
Molecular weight: M = 215,24 g.mol⁻¹

Compound **21** (302 mg, 1.02 mmol) and sodium azide (331 mg, 5.09 mmol) were heated in DMF (5 mL) at 60°C for 18h. After cooling, the reaction mixture was poured into water (15 mL) and extracted with Et₂O (3 x 25 mL). The combined organic extracts were washed with brine (2 x 15 mL) and water (15 mL) and then dried over MgSO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl acetate) to afford compound **22'** (176 mg). **Yield: 80 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.03 (s, 1H₃); 6.14 (d, ²J = 1.6 Hz, 1H_{1a}); 5.73 (d, ²J = 1.6 Hz, 1H_{1b}); 4.28 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H₅); 1.49 (s, 9H₉); 1.34 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H₆).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 162.9 (C₄); 151.5 (C₇); 130,5 (C₂); 103.8 (C₁); 85.0 (C₈); 61.0 (C₅); 27.2 (C₉); 13.1 (C₆).

HRMS: calc. for C₁₀H₁₇NO₄ [M+H]⁺ 216,1158 ; found 216.5324

Methyl 2-amino-3-hydroxypropanoate:**Compound 23****Formula:** C₄H₉NO₃**Molecular weight:** M= 119.11 g. mol⁻¹

This compound (2.56 g) was synthesized following the same procedure as for compound **19**. The crude product was concentrated to an oil, which was triturated with ice-cold diethyl ether to give the ethyl ester **23** as a white solid. **Yield: 42 %**

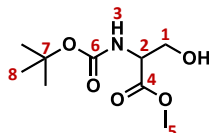
¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 5.62 (s, 2H₃), 4.05 (m, 1H₂), 3.85 (m, 2H₁), 3.69 (s, 3H₅).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 169.1 (C₄); 59.3 (C₁); 54.8 (C₂); 53.8 (C₅)

HRMS: calc. for C₄H₉NO₃ [M+H]⁺ 120.0582; found 120.1586

Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-hydroxypropanoate:

Compound 24



Formula: C₉H₁₇NO₅

Molecular weight: M = 219.23 g. mol⁻¹

This compound (2 g) was synthesized following the same procedure as for compound **20**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (hexane/ethyl acetate = 50/50) to afford a compound **24**. **Yield: 76 %**

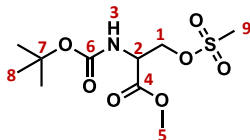
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.49 (bs, 1H₃); 4.40 (bs, 1H₂); 3.94 (dd, ²J = 10.1 Hz, ³J = 3.7 Hz, 2H₁); 3.79 (s, 3H₅); 1.45 (s, 9H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.2 (C₄); 155.7 (C₆); 80.3 (7), 63.5 (1); 55.6 (C₂); 52.6 (C₅); 28.2 (C₈).

HRMS: calc. for C₉H₁₇NO₅ [M+H]⁺ 220,1107; found 220.3596

Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((methylsulfonyl)oxy)propanoate [5]:

Compound 25



Formula: C₁₀H₁₉NO₇S

Molecular weight: M = 297.32 g.mol⁻¹

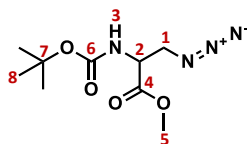
This compound (2.06 g) was synthesized following the same procedure as for compound described in the literature [5]. **Yield: 76 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.49 (bs, 1H₂), 4.53 (dd, ²J = 9.6 Hz, ³J = 3.3 Hz, 2H₁); 3.81 (s, 3H₅); 3.03 (s, 3H₉); 1.48 (s, 9H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.3 (C₄); 154.9 (C₆); 68.9 (5C₁); 63.1 (C₂); 52.9 (C₅); 37.2(C₉); 28.1 (C₈).

Methyl 3-azido-2-((tert-butoxycarbonyl) amino)propanoate [5]:

Compound 26



Formula: C₉H₁₆N₄O₄

Molecular weight: M = 244.24 g.mol⁻¹

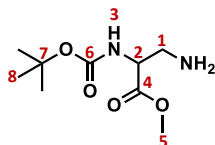
This compound (218 mg) was synthesized following the same procedure as for compound described in the literature [5]. **Yield: 49 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.37 (bs, 1H₃); 4.42 (pd, ³J = 3.3 Hz, 1H₂); 3.73 (s, 3H₅); 3.66 (d, ³J = 3.3 Hz, 2H₁); 1.39 (s, 9H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170.2 (C₄); 155.0 (C₆); 80.4 (C₇); 53.4 (C₁); 52.8 (C₂); 59.7 (C₅); 28.1 (C₈).

Methyl 3-amino-2-((tert-butoxycarbonyl) amino)propanoate [5]:

Compound 27



Formula: C₉H₁₈N₂O₄

Molecular weight: M = 218.25 g. mol⁻¹

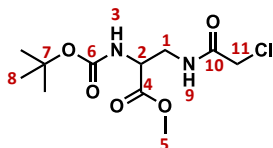
This compound (1.30 g) was synthesized following the same procedure as for compound described in the literature [5]. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl acetate: MeOH 80/20) to afford a compound **27**. **Yield: 45 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.42 (bs, 1H₃); 4.24 (m, 1H₂); 3.73 (s, 3H₅); 3.06 (m, 2H₁); 1.44 (s, 9H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.2 (C₄); 155.7 (C₆); 80.3 (C₇); 53.9 (C₁); 52.7 (C₁); 42.5 (C₅); 28.3 (C₈).

Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(2-chloroacetamido)propanoate:

Compound 28



Formula: C₁₁H₁₉ClN₂O₅

Molecular weight: M = 294.73 g. mol⁻¹

This compound (1.43 g) was synthesized following the same procedure as for compound **8**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (ethyl acetate) to afford a compound **28**. **Yield: 81 %**

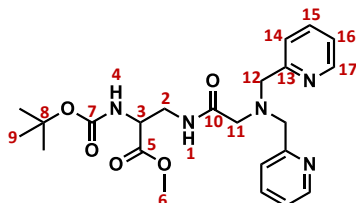
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.79 (d, ³J = 6.6 Hz, 1H₃); 7.55 (t, ³J = 5.5 Hz, 1H₉); 4.70 (m, 1H₂); 4.09 (s, 2H₁₁); 3.81 (s, 3H₅); 3.75 (m, 2H₁); 1.34 (s, 9H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.9 (C₄); 167.6 (C₁₀); 167.0 (C₆); 80.0 (C₇); 53.2 (C₂); 53.1 (C₅); 42.2 (C₁₁); 41.2 (C₁); 28.1 (C₈).

HRMS: calc. for C₁₁H₁₉ClN₂O₅ [M+H]⁺ 295,0982 ; found 295.1053

Methyl 3-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetamido)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate:

Compound 29



Formula: C₂₃H₃₁N₅O₅

Molecular weight: M = 457,52 g.mol⁻¹

This compound (1.29 g) was synthesized following the same procedure as for compound **8**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (ethyl acetate) to afford a compound **28**. **Yield: 58 %**

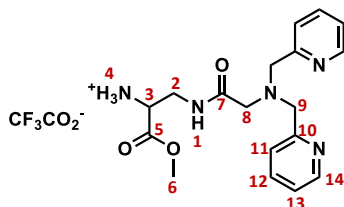
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.96 (t, ³J = 6.5 Hz, 1H₁); 8.57 (d, ³J = 4.2 Hz, 2H₁₇); 7.57 (m, 2H₁₅); 7.17 (d, ³J = 7.8 Hz, 2H₁₄); 7.11 (m, 2H₁₆); 6.62 (d, ³J = 8.3 Hz, 1H₄); 4.50 (m, 1H₃); 4.00 (m, 1H_{2a}); 3.68 (d, ²J = 13.8 Hz, 4H₁₂); 3.59 (s, 3H₆); 3.50 (m, 1H_{2b}); 3.21 (s, 2H₁₁); 1.36 (9H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.7 (C₅); 171.5 (C₁₀); 170.4 (C₇); 158.7 (C₁₃); 149.6 (C₁₇); 136.5 (C₁₄); 123.4 (C₁₄); 122.1 (C₁₆); 79.6 (C₈); 59.8 (C₁₂); 57.9 (C₁₁); 54.0 (C₃); 52.2 (C₆); 40.8 (C₂); 28.2 (C₉).

HRMS: calc. for C₂₃H₃₁N₅O₅ [M+H]⁺ 458,2325; found 458.1566

3-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino) acetamido)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium 2,2,2-trifluoroacetate:

Compound 30



Formula: C₂₀H₂₄F₃N₅O₅

Molecular weight: M = 471,43 g. mol⁻¹

This compound (1.33 g) was synthesized following the same procedure as for compound 13. **Yield: 100 %**

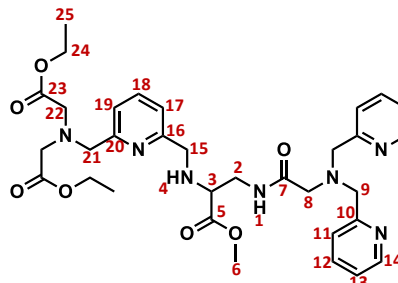
¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 8.46 (d, ³J = 5.0 Hz, 2H₁₄); 7.66 (m, 2H₁₂); 7.33 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H₁₃); 7.19 (m, 2H₁₁); 3.72 (s, 4H₉); 3.64 (m, 1H₃); 3.57 (s, 3H₆); 3.44 (m, 2H₂); 3.22 (s, 2H₈).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 176.6 (C₅); 174.2 (C₇); 159.3 (C₁₀); 150.6 (C₁₄); 138.8 (C₁₂); 125.5 (C₁₁); 124.3 (C₁₃); 61.6 (C₉); 59.3 (C₈); 55.5 (C₆); 50.2 (C₃); 44.0 (C₂).

HRMS: calc. for C₁₈H₂₃N₅O₃ [M+H]⁺ 358,1801; found 358.2655

Diethyl 2,2'-(((6-(((3-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetamido)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:

Compound 31



Formula: $C_{33}H_{43}N_7O_7$

Molecular weight: $M = 649,74 \text{ g. mol}^{-1}$

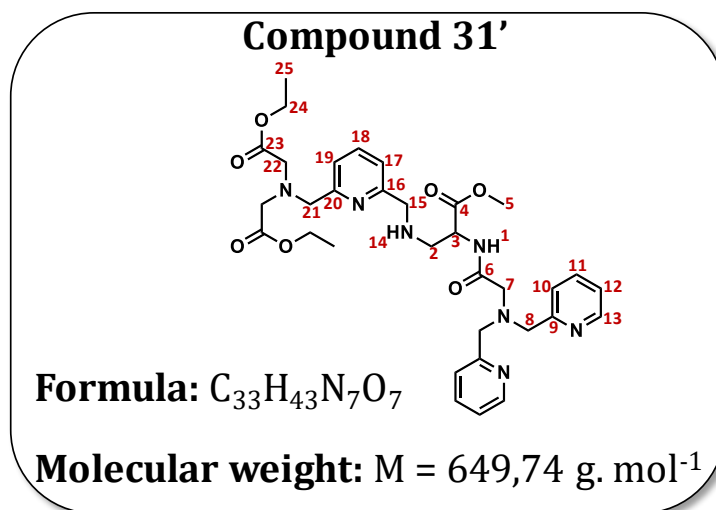
This compound was synthesized following the same procedure as for compound 2.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.83 (t, $^3J = 5.8 \text{ Hz}$, 1H_1); 8.49 (d, $^3J = 5.2 \text{ Hz}$, 2H_{14}); 7.58 – 7.53 (m, 2H_{12} and 1H_{18}); 7.45 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H_{19}); 7.29 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H_{11}); 7.18 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H_{17}); 7.11 (m, 2H_{13}); 4.15 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 4H_{24}); 4.01 (s, 2H_{21}); 3.94 – 3.78 (m, 2H_7 and 4H_8); 3.72 (m, 1H_{2a}); 3.62 (s, 3H_6); 3.58 (s, 4H_{22}); 3.56 (m, 1H_{2b}); 3.53 (m, 1H_3); 3.28 (s, 2H_{15}); 1.24 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 6H_{25}).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173.5 (C_5); 171.4 (C_7); 171.1 (C_{23}); 158.6 (C_{20}); 158.5 (C_{16}); 158.2 (C_{10}); 149.2 (C_{14}); 137.0 (C_{18}); 136.5 (C_{12}); 123.2 (C_{11}); 122.3 (C_{13}); 121.1 (C_{19}); 120.3 (C_{17}); 60.50 (C_{22}); 60.4 (C_3); 60.3 (C_9); 59.9 (C_{21}); 58.0 (C_{15}); 54.8 (C_{22}); 53.2 (C_7); 52.0 (C_6); 41.0 (C_2); 14.2 (C_{25}).

HRMS: calc. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 650,3224; found 650.1358

Diethyl 2,2'-(((6-(((2-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetamido)-3-methoxy-3-oxopropyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:



This compound was synthesized following the same procedure as for compound **2**.

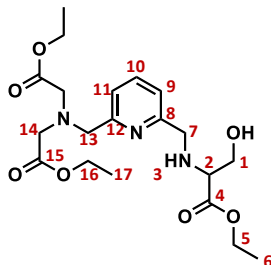
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.07 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_1); 8.45 (d, $^3J = 4.8 \text{ Hz}$, 2H_{13}); 7.52 -7.47 (m, 2H_{11} and 1H_{18}); 7.40 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H_{19}); 7.33 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 2H_{10}); 7.26 (m, 1H_{17}); 7.08 (m, 2H_{12}); 4.72 (m, 1H_3); 4.10 (q, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 4H_{24}); 3.96 (s, 2H_{21}); 3.83 (d, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, 4H_8); 3.65 (s, 3H_5); 3.61 (m, 2H_{15}); 3.54 (s, 4H_{22}), 3.31 (d, $^2J = 16.8 \text{ Hz}$, 2H_7); 2.90 (m, 2H_2); 1.20 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 6H_{25}).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.2 (C_4); 171.3 (C_6); 171.1 (C_{23}); 158.4 (C_9); 158.3 (C_{16}); 158.1 (C_{20}); 149.2 (C_{12}); 137.0 (C_{18}); 136.5 (C_{11}); 123.1 (C_{10}); 122.3 (C_{12}); 121.2 (C_{19}); 121.1 (C_{17}); 64.1 (C_{15}); 60.5 (C_{24}); 60.2 (C_8); 59.9 (C_{21}); 58.7 (C_2); 57.8 (C_7); 52.2 (C_5); 51.2 (C_3); 14.2 (C_{25}).

HRMS: calc. for $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 650.3224; found 650.1358

Diethyl

2,2'-(((6-(((1-ethoxy-3-hydroxy-1-oxopropan-2-yl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:

Compound 32**Formula:** C₂₀H₃₁N₃O₇**Molecular weight :** M= 425,48 g.mol⁻¹

This compound **32** (750 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **20**. **Yield: 74 %**

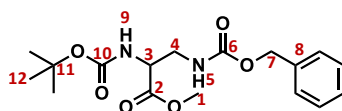
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.65 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H₁₀); 7.46 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H₁₁); 7.18 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H₉); 4.20 – 4.15 (m, 4H₁₆ and 2H₅); 4.04 (s, 2H₁₃); 4.00 (d, ²J = 13.4 Hz, 1H_{7a}); 3.92 (d, ²J = 13.4 Hz, 1H_{7b}); 3.80 (m, 2H₁); 3.60 (s, 4H₁₄), 3.48 (m, 1H₂); 1.27 (m, 3H₆ and 6H₁₇).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.7 (C₄); 171.1 (C₁₅); 158.4 (C₁₂); 158.3 (C₈); 137.2 (C₁₀); 121.4 (C₁₁); 120.7 (C₉); 62.6 (C₂); 62.4 (C₁₃); 60.9 (C₁); 60.5 (C₁₆); 59.6 (C₅); 54.7 (C₁₄); 52.6 (C₇); 14.13 (C₆ and C₁₇).

HRMS: calc. for C₂₀H₃₁N₃O₇ [M+H]⁺ 426,2162; found 426.2356

Methyl 3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate:

Compound 34



Formula: C₁₇H₂₄N₂O₆

Molecular weight: M = 352,38 g. mol⁻¹

To a mixture of A solution of (S)-N α -Boc,N β -Cbz-diaminopropionic acid dicyclohexylammonium salt (1.0 g, 1.93 mmol) in 5 mL of methylene chloride was added 5 mL of methanol. To this solution was slowly added (trimethylsilyl)diazomethane (2 M in ether, 7.9 mL, 15.8 mmol) over 1 h. The mixture was stirred at room temperature for 4 h until all of the solid was dissolved and the solution turned to light yellow. The evaporation of the volatile species gave 3-amino-2(S)-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate **34** (679 mg). **Yield: 100 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.30 (s, 5H₈), 5.75 (d, ³J = 6.4 Hz, 1H₉); 5.70 (bs, 1H₅); 5.06 (s, 2H₇); 4.34 (bs, 1H₃); 3.68 (s, 3H₁); 3.60 (m, 2H₄); 1.42 (s, 9H₁₂).

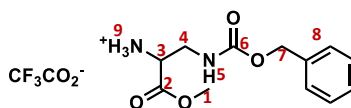
¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.3 (C₂); 156.9 (C₁₀); 155.5 (C₆); 136.4-128.0 (C₈); 79.9 (C₁₁); 66.8 (C₇); 54.1 (C₃); 52.4 (C₁); 42.7 (C₄); 28.2 (C₁₂).

HRMS: calc. for C₁₇H₂₄N₂O₆ [M+H]⁺ 353,1634 ; found 353.1527

**3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-methoxy-1-oxopropan-2-aminium
trifluoroacetate**

2,2,2-

Compound 35



Formula: C₁₄H₁₇F₃N₂O₆

Molecular weight : M= 366,29 g.mol⁻¹

This compound **35** (706.4 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **13**. **Yield: 100 %**

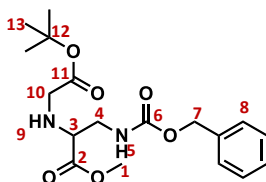
¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.33-7.27 (m, 5H₈); 5.10 (s, 2H₇); 4.20 (t, ³J = 4.6 Hz, 1H₃); 3.79 (s, 3H₁); 3.61-3.68 (m, 2H₄).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 167.9 (C₂); 157.9 (C₆); 136.3-127.8 (C₈); 66.8 (C₇); 53.3 (C₃); 52.5 (C₁); 40.4 (C₄).

HRMS: calc. for C₁₂H₁₆N₂O₄ [M+H]⁺ 253,1110; found 253.1186

Methyl 3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)propanoate

Compound 36



Formula: C₁₈H₂₆N₂O₆

Molecular weight: M = 366,41 g. mol⁻¹

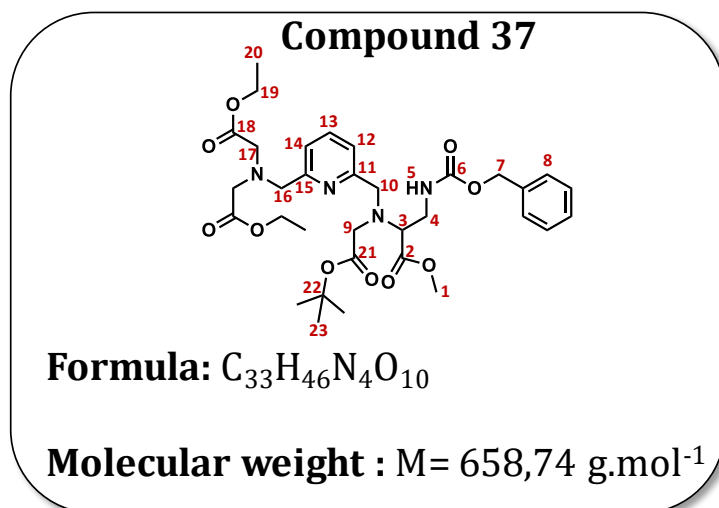
This compound **36** (788 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **20**. **Yield: 58 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.35 – 7.27 (m, 5H₈); 5.48 (s, 1H₅); 5.09 (s, 2H₇); 3.72 (s, 3H₁); 3.56 – 3.36 (m, 2H₄); 3.40 (s, 1H₃); 3.32 (s, 2H₁₀); 1.45 (s, 9H₁₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.8 (C₂); 171.1 (C₁₁); 156.4 (C₆); 136.5 – 128.0 (C₈); 81.5 (C₁₂); 66.7 (C₇); 60.2 (C₃); 52.3 (C₁); 49.6 (C₁₀); 42.5 (C₄); 28.0 (C₁₃).

HRMS: calc. for C₁₈H₂₆N₂O₆ [M+H]⁺ 367,1791 ; found 367.1863

Diethyl 2,2'-(((6-(((3-(((benzyloxy)carbonyl) amino)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:



This compound **37** (1.41 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **12**. **Yield: 72 %**

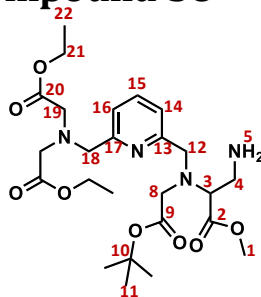
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.55 (pt, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H_{13}); 7.46 (d, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H_{14}); 7.40 - 7.32 (m, 5H_8); 7.30 (d, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H_{12}); 6.70 (s, 1H_5); 5.11 (s, 2H_7); 4.15 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 4H_{19}); 4.06 - 3.95 (m, 4H_{10} and 16); 3.79 (m, 1H_4); 3.72 (s, 3H_1); 3.36 - 3.59 (m, 1H_3); 3.49 (s, 4H_{17}); 3.42 (s, 2H_9); 3.23 (m, 1H_{17}); 1.38 (s, 9H_{23}); 1.25 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 6H_{20}).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.5 (C2); 171.2 (C21); 171.1 (C18); 158.7 (C15); 158.3 (C11); 156.6 (C6); 137.3 (C13); 128.4 - 127.9 (C8); 121.4 (C14); 121.1 (C12); 81.3 (C22); 66.4 (C7); 63.8 (C3); 60.5 (C19); 59.8 (C16); 57.4 (C10); 54.8 (C17); 53.8 (C9); 51.6 (C1); 40.1 (C4); 28.0 (C23); 14.2 (C20)

HRMS: calc. for $C_{33}H_{46}N_4O_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 659,3214 ; found 659.3287

Diethyl 2,2'-(((6-(((3-amino-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl) amino)methyl)pyridin-2-yl) methyl)azanediyl)diacetate:

Compound 38



Formula: C₂₅H₄₀N₄O₈

Molecular weight: M = 524,61 g.mol⁻¹

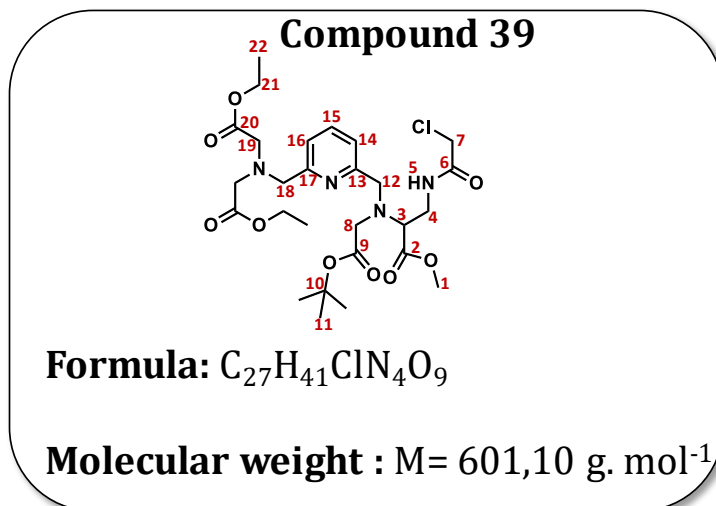
Compound **37** (1.40 g) was hydrogenated with Pd/C (0.150 g) under hydrogen in MeOH. Palladium catalyst was removed by filtration through celite. The filtrate was concentrated and dried under vacuum overnight to give compound **38** (937 mg). **Yield: 83 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.60 (pt, ³J = 7.6 Hz, 1H₁₅); 7.10 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H₁₆); 7.06 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H₁₄); 4.26 (bs, 2H₅); 4.14 (q, ³J = 7.1 Hz, 4H₂₁); 4.12 (m, 4H₁₂ and H₁₈); 3.76 (s, 3H₁); 3.65 (s, 4H₁₉); 3.60 (s, 2H₈); 3.59 – 3.47 (m, 2H₄); 3.24 (s, 1H₃); 1.37 (s, 9H₁₁); 1.24 (t, ³J = 7.1 Hz, 6H₂₂).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 171.8 (C₂₀); 171.0 (C₂); 170.0 (C₉); 159.3 (C₁₇); 157.3 (C₁₃); 137.8 (C₁₅); 122.4 (C₁₆); 121.4 (C₁₄); 81.7 (C₁₀); 62.1 (C₃); 61.0 (C₁₂); 60.5 (C₁₈); 54.6 (C₈); 52.0 (C₁); 38.6 (C₄); 27.9 (C₁₁); 14.1 (C₂₂).

HRMS: calc. for C₂₅H₄₀N₄O₈ [M+H]⁺ 525,2846 ; found 525.2917

Diethyl 2,2'-(((6-(((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)(3-(2-chloroacetamido)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:



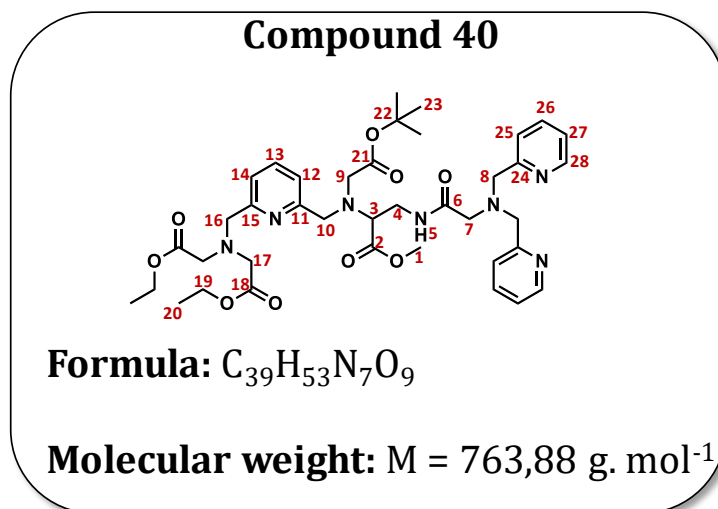
This compound **39** (773 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **8**. **Yield: 72 %**

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.00 (bs, 1H₅); 7.58 (pt, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H₁₅); 7.42 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H₁₆); 7.35 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H₁₄); 4.08 (q, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 4H₂₁); 3.97 (s, 2H₇); 3.90 (s, 2H₁₈); 3.89 (s, 2H₁₂); 3.83 (m, 1H_{4a}); 3.68 (s, 3H₁); 3.62 – 3.57 (m, 1H_{4b}); 3.53 (s, 4H₁₉); 3.40 (m, 2H₈); 3.17 (t, $^3J = 11.4 \text{ Hz}$, 1H₃); 1.34 (s, 9H₁₁); 1.19 (t, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 6H₂₂).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.5 (C₂); 171.4 (C₂₀); 171.0 (C₉); 166.2 (C₆); 158.5 (C₁₇); 158.2 (C₁₃); 137.3 (C₁₅); 121.5 (C₁₆); 121.0 (C₁₄); 81.4 (C₁₀); 62.9 (C₃); 60.4 (C₂₁); 59.8 (C₁₈); 57.9 (C₁₂); 54.8 (C₁₉); 53.6 (C₈); 51.7 (C₁); 42.9 (C₇); 38.8 (C₄); 27.9 (C₁₁); 14.2 (C₂₂).

HRMS: calc. for $C_{27}H_{41}ClN_4O_9$ $[M+H]^+$ 601.2562 ; found 601.2630

Diethyl 2,2'-(((6-(((3-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)acetamido)-1-methoxy-1-oxopropan-2-yl)(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl) amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:



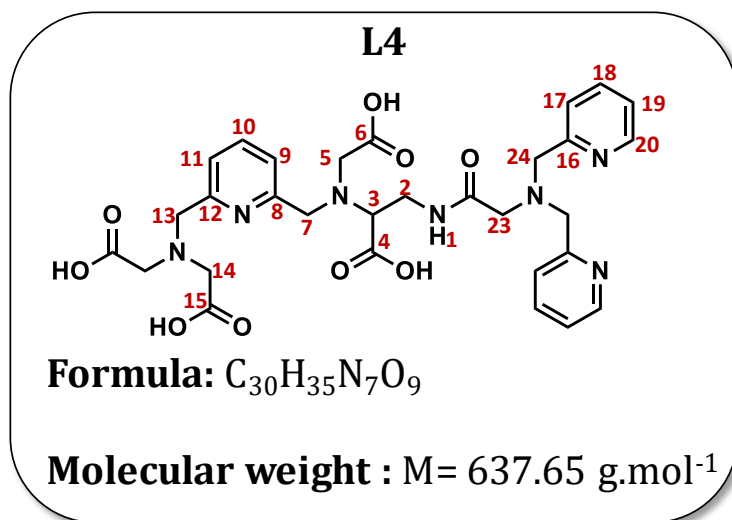
To a solution of 2,2-dipicolylamine (297.5 mg, 1.49 mmol), K_2CO_3 (276 mg, 1.9 mmol), and NaI (20 mg, 0.13 mmol) in acetonitrile (5 mL) was added compound **39** (358 mg, 0.59 mmol), and the reaction mixture was stirred for 23h at room temperature. **Yield:** 69 %

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.53 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 1H₅); 8.44 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 2H₂₈); 7.50 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H₂₆); 7.45 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 2H₂₅); 7.32 (m, 3H_{12, 13, 14}); 7.07 (t, $^3J = 5.6$ Hz, 2H₂₇); 4.08 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 4H₂₁); 3.93 (s, 2H₁₆); 3.90 (d, $^2J = 15.1$ Hz, 2H₁₀); 3.79 (s, 2H_{8a}); 3.78 (s, 2H_{8b}); 3.72 (m, 1H_{4a}); 3.67 (t, $^3J = 8.4$ Hz, 1H₃); 3.59 (s, 3H₁); 3.51 (s, 4H₁₇); 3.44 (s, 2H₉); 3.37 (m, 1H_{4b}); 3.23 (s, 2H₇); 1.36 (s, 9H₂₃); 1.18 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 6H₂₀).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 171.6 (C₂); 171.1 (C₁₈); 171.1 (C₆); 171.0 (21); 158.5 (C₁₅); 158.4 (C₂₄); 158.1 (C₁₁); 149.2 (C₂₈); 137.1 (C₁₃); 136.4 (C₂₆); 123.1 (C₂₅); 122.23 (C₂₇); 121.2 (C₁₄); 120.7 (C₁₂); 81.0 (C₂₂); 63.4 (C₃); 60.5 (C₈); 60.4 (C₁₉); 59.9 (C₁₆); 58.1 (C₁₀); 58.0 (C₇); 54.8 (C₁₇); 53.2 (C₉); 51.6 (C₁); 38.8 (C₄); 28.0 (C₂₃); 14.2 (C₂₀).

HRMS: calc. for $C_{39}H_{53}N_7O_9$ $[M+H]^+$ 764,3905; found 764.3983

2,2'-(((6-(((2-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl) amino)acetamido)-1-carboxyethyl) (carboxymethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetic acid:



This compound (259 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **L2**. The crude product was purified on C18 phase (MeOH: H₂O 1:1 with 0,1 % TFA). **Yield: 100 %**

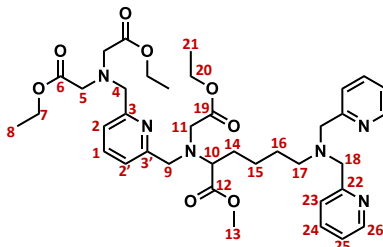
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.46 (d, ³J = 5.6 Hz, 2H₂₀); 7.80 - 7.73 (m, 1H₁₀ and 2H₁₈); 7.31 (m, 2H₁₇ and 2H₁₉); 7.22 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H₉ and 1H₁₁); 4.21 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H₃); 3.95 (s, 4H₂₄); 3.94 (bs, 2H₇ and 2H₁₃); 3.65 (m, 1H₂); 3.40 (m, 1H₂); 3.31 (s, 4H₁₄); 3.30 (s, 2H₅); 3.29 (s, 2H₂₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 174.7 (C₄); 173.1 (C₆ and C₁₄); 170.1 (C₂₁); 157.8 (C₁₆); 155.6 (C₈ and C₁₂); 147.2 (C₂₀); 139.5 (C₁₈), 136.2 (C₁₀); 124.0 (C₁₇); 121.1 (C₉ and C₁₁); 120.9 (C₁₉); 73.5 (C₃); 62.1 (C₁₃); 62.0 (C₈); 60.1 (C₁₄); 60.0 (C₇); 59.2 (C₂₃); 57.0 (C₅); 38.2 (C₂).

HRMS: calc. for C₃₀H₃₅N₇O₉ [M+H]⁺ 638.2496; found 638.3983

Diethyl 2,2'-(((6-(((6-(bis(pyridin-2-ylmethyl) amino)-1-methoxy-1-oxohexan-2-yl)(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl) pyridin-2-yl)methyl)azanediyl)diacetate:

Compound 41



Formula: C₃₈H₅₂N₆O₈

Molecular weight : M = 720.85 g.mol⁻¹

This compound (350 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **15**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl Acetate, 1% triethylamine) to afford a compound **41**. **Yield: 83 %**

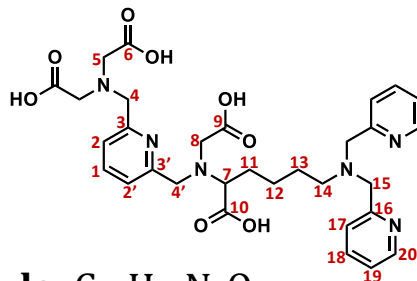
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.57 (d, ³J = 4.4 Hz, 2H₂₆); 7.64 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H₂₄); 7.59 (t, ³J = 7.8 Hz, 1H₁); 7.51 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₂); 7.456 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H_{2'}); 7.14 (t, ³J = 5.8 Hz, 2H₂₅); 4.16 (q, ³J = 7.1 Hz, 4H₇); 4.10 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H₂₀); 4.02 (s, 2H₄); 3.96 (d, ²J = 15.7 Hz, 2H₉); 3.79 (s, 4H₁₈); 3.68 (s, 3H₁₃); 3.60 (s, 4H₅); 3.51 (d, ²J = 17.6 Hz, 2H₁₁); 3.39 (t, ³J = 7.7 Hz, 1H₁₀); 2.52 (t, ³J = 6.7 Hz, 2H₁₇); 1.65 (bs, 2H₁₄); 1.53 (m, 2H₁₆); 1.39 (bs, 2H₁₅); 1.26 (t, ³J = 7.1 Hz, 6H₈); 1.21 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H₂₁).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 173.4 (C₁₂); 171.5 (C₁₉); 171.1 (C₆); 159.9 (C₂₂); 159.2 (C_{3'}); 158.0 (C₃); 148.8 (C₂₆); 137.1 (C₁); 136.3 (C₂₄); 122.8 (C₂₃); 121.8 (C₂₅); 121.1 (C_{2'}); 120.8 (C₂); 63.7 (C₁₀); 60.4 (C₇); 60.4 (C₂₀); 60.4 (C₁₈); 59.8 (C₄); 57.6 (C₉); 54.8 (C₅); 54.1 (C₁₇); 52.5 (C₁₁); 51.2 (C₁₃); 30.0 (C₁₄); 26.8 (C₁₆); 23.9 (C₁₅); 14.2 (C₈); 14.1 (C₂₁).

HRMS: calc. for C₃₈H₅₂N₆O₈ [M+H]⁺ 721.3847 ; found 721.2156

2,2'-(((6-(((5-(bis(pyridin-2-ylmethyl) amino)-1-carboxypentyl)(carboxymethyl) amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl) azanediyl)diacetic acid

L5



Formula: C₃₁H₃₈N₆O₈

Molecular weight: M= 622.67 g.mol⁻¹

This compound (302 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **L5**. The crude product was purified on C18 phase (MeOH: H₂O 1:1 with 0,1 % TFA). **Yield: 100 %**

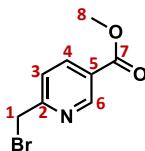
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.66 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H₂₀); 8.45 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H₁₈); 8.01 (t, ³J = 7.6 Hz, 1H₁); 7.98 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H₁₇); 7.88 (t, ³J = 5.5 Hz, 2H₁₉); 7.54 (m, 1H₂ and 1H_{2'}); 4.58 (s, 2H₄); 4.55 (2H_{4'}); 4.24 (s, 4H₁₅); 4.02 (s, 4H₅); 3.91 (s, 2H₈); 3.84 (m, 1H₇); 2.63 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H₁₄); 1.80 (m, 2H₁₁); 1.47 (bs, 2H₁₃); 1.31 (bs, 2H₁₂).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 174.7 (C₁₀); 173.1 (C₆ and C₉); 157.8 (C₁₆); 155.7 (C₃ and C_{3'}); 148.6 (C₂₀); 139.6 (C₁₈); 136.2 (C₁); 124.0 (C₁₇); 122.2 (C₁₉); 121.0 (C₂ and C_{2'}); 72.3 (C₇); 63.5 (C₁₅); 62.5 (C₄); 60.3 (C_{4'}); 60.1 (C₅); 57.9 (C₈); 56.4 (C₁₄); 28.6 (C₁₁); 28.0 (C₁₃); 23.8 (C₁₂).

HRMS: calc. for C₃₁H₃₈N₆O₈ [M+H]⁺ 621.2751; found 621.2686

Methyl 6-(bromomethyl)nicotinate

Compound 42



Formula: C₈H₈BrNO₃

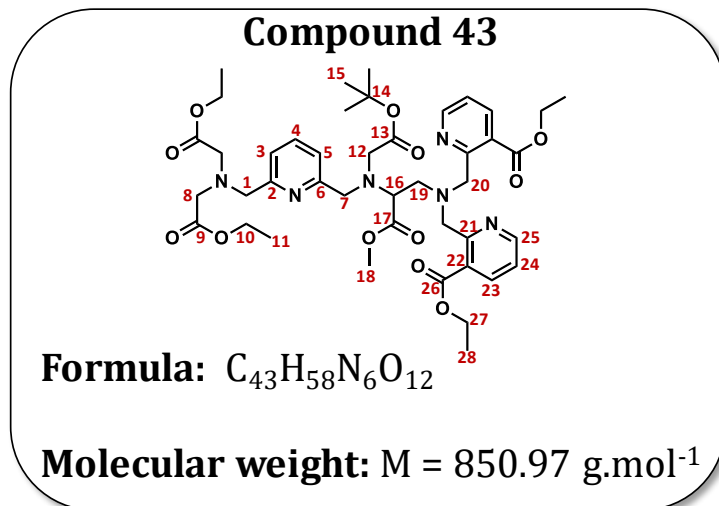
Molecular weight: M = 230.06 g.mol⁻¹

This compound (509 mg) was synthesized following the same procedure as for compound 3. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂: Ethyl acetate 93:7). **Yield: 42 %**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.14 (s, 1H₆); 8.28 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₄); 7.52 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H₃); 4.56 (s, 2H₁); 3.94 (s, 3H₈).

HRMS: calc. for C₈H₈BrNO₃ [M+H]⁺ 229.9738; 231.9722; found 229.9812; 231.9792

Diethyl 2,2'-(((2-(((6-((bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl) (2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl) amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)azanediyl) bis(methylene))dinicotinate:



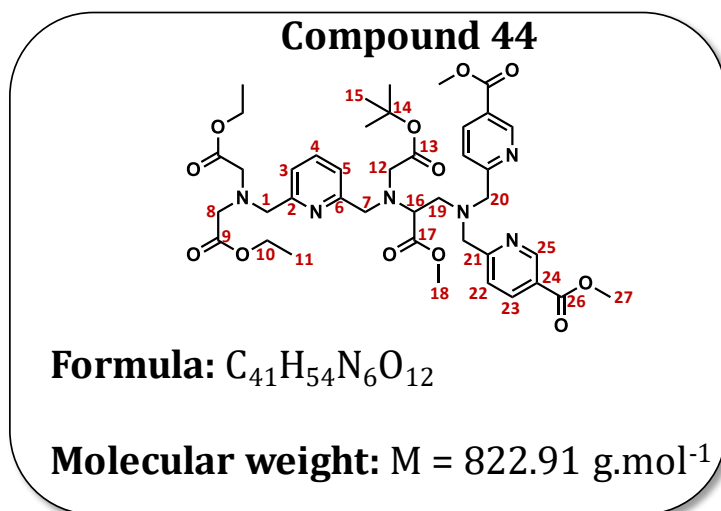
This compound (250 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **15**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl acetate: MeOH 98:2). **Yield: 78 %**

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.48 (d, $^3J = 5.1 \text{ Hz}$, 2H_{25}); 7.95 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H_{23}); 7.51 (pt, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_4); 7.39 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_3); 7.33 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H_5); 7.11 (dd, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, $^3J = 5.1 \text{ Hz}$, 2H_{24}); 4.33 (s, 4H_{20}); 4.21 (q, $^3J = 7.3 \text{ Hz}$, 4H_{27}); 4.05 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 4H_{10}); 3.93 (s, 2H_1); 3.77 (s, 2H_7); 3.52 (s, 4H_8); 3.45 (s, 3H_{18}); 3.41 (m, 1H_{16}); 3.19 (m, 2H_{12}); 3.08 (m, 2H_{19}); 1.29 (s, 9H_{15}); 1.28 (t, $^3J = 7.3 \text{ Hz}$, 6H_{28}); 1.18 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 6H_{11}).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.1 (C17), 171.2 (C9), 170.6 (C13), 166.6 (C26), 159.5 (C21), 157.8 (C2 and C6), 150.6 (C25), 137.8 (C23), 137.1 (C4), 127.2 (C22), 121.4 (C3), 120.8 (C5), 120.7 (C24), 80.4 (C14), 62.6 (C16), 61.2 (C27), 60.5 (C10), 60.4 (C1), 58.7 (C20), 57.9 (C8), 54.8 (C8), 53.8 (C12), 53.5 (C19), 51.0 (C18), 28.0 (C15), 14.2 (C28), 14.1 (C11).

HRMS: calc. for $C_{43}H_{58}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 851.4113; found 851.4184

Dimethyl 6,6'-(((2-(((6-((bis(2-ethoxy-2-oxoethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)azanediyl) bis(methylene))dinicotinate:



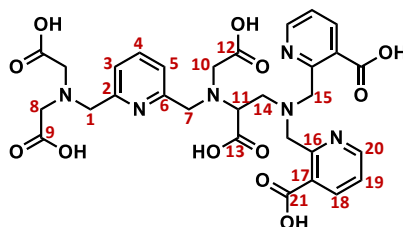
This compound (246 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **15**. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Ethyl acetate: MeOH 98:2). **Yield: 78 %**

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.99 (s, 2H₂₅); 8.13 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H₂₃); 7.51 (pt, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₄); 7.41 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H₂₂); 7.37 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₃); 7.32 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₅); 4.05 (q, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 4H₁₀); 3.92 (s, 2H₁); 3.88 (m, 2H₇); 3.86 (s, 6H₂₇); 3.8 (m, 4H₂₀); 3.72 (m, 1H₁₆); 3.59 (s, 3H₁₈); 3.51 (s, 4H₈); 3.30 (m, 2H₁₂); 2.92 (m, 2H₁₉); 1.33 (s, 9H₁₅); 1.17 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 6H₁₁) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.3 (C₁₇), 171.1 (C₉), 170.5 (C₁₃), 165.7 (C₂₆), 158.8 (C₂₁), 157.2 (C₂ and C₆), 150.2 (C₂₅), 137.7 (C₄), 137.4 (C₂₄), 124.5 (C₂₃), 122.6 (C₂₂), 119.9 (C₃ and C₅), 80.9 (C₁₄), 64.4 (C₁₀), 62.6 (C₁₆), 60.4 (C₂₀), 60.3 (C₁), 59.8 (C₇), 57.7 (C₁₂), 54.8 (C₈), 53.3 (C₁₉), 52.3 (C₂₆), 51.4 (C₁₈), 28.0 (C₁₅), 14.2 (C₁₁).

HRMS: calc. for $C_{41}H_{54}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 823.3800; found 823.3872

2,2'-(((2-(((6-((bis(carboxymethyl)amino) methyl)pyridin-2-yl)methyl) (carboxymethyl)amino)-2-carboxyethyl) azanediyl)bis (methylene))dinicotinic acid:

L6

Formula: $C_{30}H_{32}N_6O_{12}$

Molecular weight: $M = 668.62 \text{ g.mol}^{-1}$

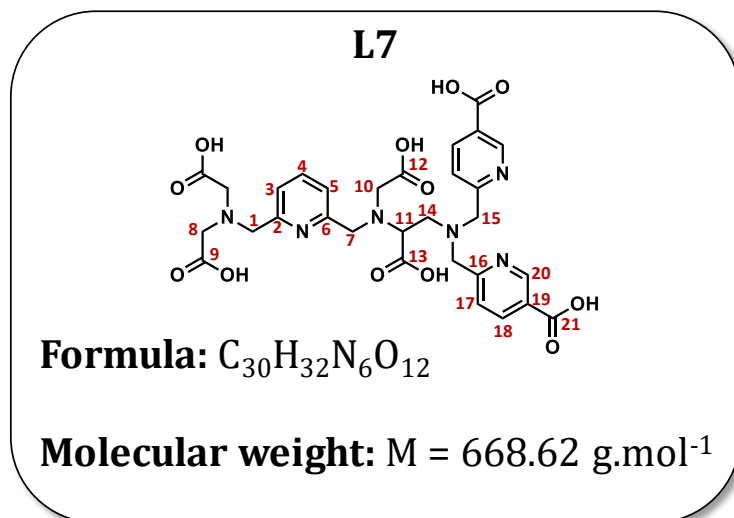
This compound (195 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **L4** by using compound **43**. The crude product was purified purification on C18 phase (MeOH: H₂O 1:1 with 0,1 % TFA). **Yield: 100 %**

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.46 (d, $^3J = 5.1 \text{ Hz}$, 2H₂₀); 8.30 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H₁₈); 7.87 (t, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₄); 7.58 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₃); 7.51 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₅); 7.48 (dd, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, $^3J = 5.1 \text{ Hz}$, 2H₁₉); 4.8 (m, 4H₁₅); 4.46 (s, 2H₁); 4.35 (m, 1H₁₁); 4.30 (m, 2H₇); 3.86 (s, 4H₈); 3.80 (m, 2H₁₄); 3.72 (m, 2H₁₀).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 172.3 (C13), 171.1 (C9 and C12), 170.5 (C21), 165.7 (C16), 157.2 (C2 and C6), 150.2 (C20), 137.7 (C18), 137.4 (C4), 124.5 (C17), 122.6 (C19), 119.9 (C3 and C5), 80.9 (C11), 64.4 (C1), 62.6 (C8), 60.4 (C15), 60.3 (C7), 59.8 (C10), 57.7 (C14).

HRMS: calc. for $C_{30}H_{32}N_6O_{12}$ $[M+H]^+$ 669.2078; found 669.2144

6,6'-(((2-(((6-((bis(carboxymethyl)amino) methyl)pyridin-2-yl)methyl) (carboxymethyl)amino)-2-carboxyethyl) azanediyl)bis(methylene)) dinicotinic acid:



This compound (192 mg) was synthesized following the same procedure as for compound **L4** by using compound **44**. The crude product was purified purification on C18 phase (MeOH: H₂O 1:1 with 0,1 % TFA). **Yield: 100 %**

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 8.87 (s, 2H₂₀); 8.40 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H₁₈); 7.84 (t, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₄); 7.64 (d, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H₁₇); 7.45 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₃); 7.40 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H₅); 4.8 (m, 4H₁₅); 4.46 (s, 2H₁); 4.35 (m, 1H₁₁); 4.30 (m, 2H₇); 3.86 (s, 4H₈); 3.80 (m, 2H₁₄); 3.72 (m, 2H₁₀).

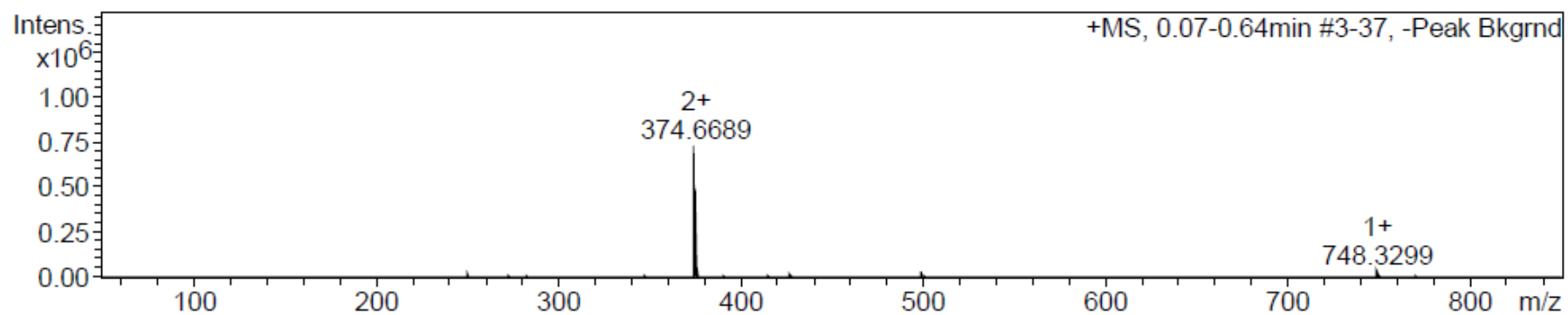
¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 172.3 (C₁₃), 171.1 (C₉ and C₁₂), 170.5 (C₂₁), 165.7 (C₁₆), 157.2 (C₂ and C₆), 150.2 (C₂₀), 137.7 (C₁₈), 137.4 (C₄), 124.5 (C₁₇), 122.6 (C₁₉), 119.9 (C₃ and C₅), 80.9 (C₁₁), 64.4 (C₁), 62.6 (C₈), 60.4 (C₁₅), 60.3 (C₇), 59.8 (C₁₀), 57.7 (C₁₄).

HRMS: calc. for $C_{30}H_{32}N_6O_{12}$ [M+H]⁺ 669.2078; found 669.2144

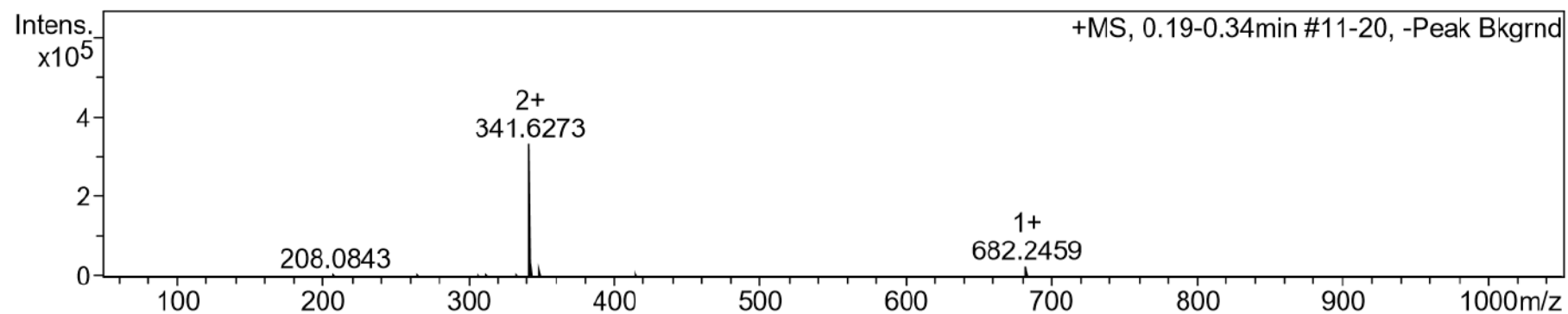
- [1] P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, "Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs," *Talanta*, vol. 43, no. 10, pp. 1739–1753, Oct. 1996.
- [2] Martell, AE, Smith, RM, and Motekaitis, RJ, "Critical stability constants of metal complexes database, Version 4.0," *NIST standard reference database*, 46.
- [3] W. S. Perry, S. J. A. Pope, C. Allain, B. J. Coe, A. M. Kenwright, and S. Faulkner, "Synthesis and photophysical properties of kinetically stable complexes containing a lanthanide ion and a transition metal antenna group," *Dalton Trans.*, vol. 39, no. 45, p. 10974, 2010.
- [4] T. Terauchi, K. Kobayashi, K. Okuma, M. Oba, K. Nishiyama, and M. Kainosho, "Stereoselective Synthesis of Triply Isotope-Labeled Ser, Cys, and Ala: Amino Acids for Stereoarray Isotope Labeling Technology," *Org. Lett.*, vol. 10, no. 13, pp. 2785–2787, Jul. 2008.
- [5] D. Shetty *et al.*, "Synthesis and evaluation of macrocyclic amino acid derivatives for tumor imaging by gallium-68 positron emission tomography," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 21, pp. 7338–7347, Nov. 2010.

Annexes

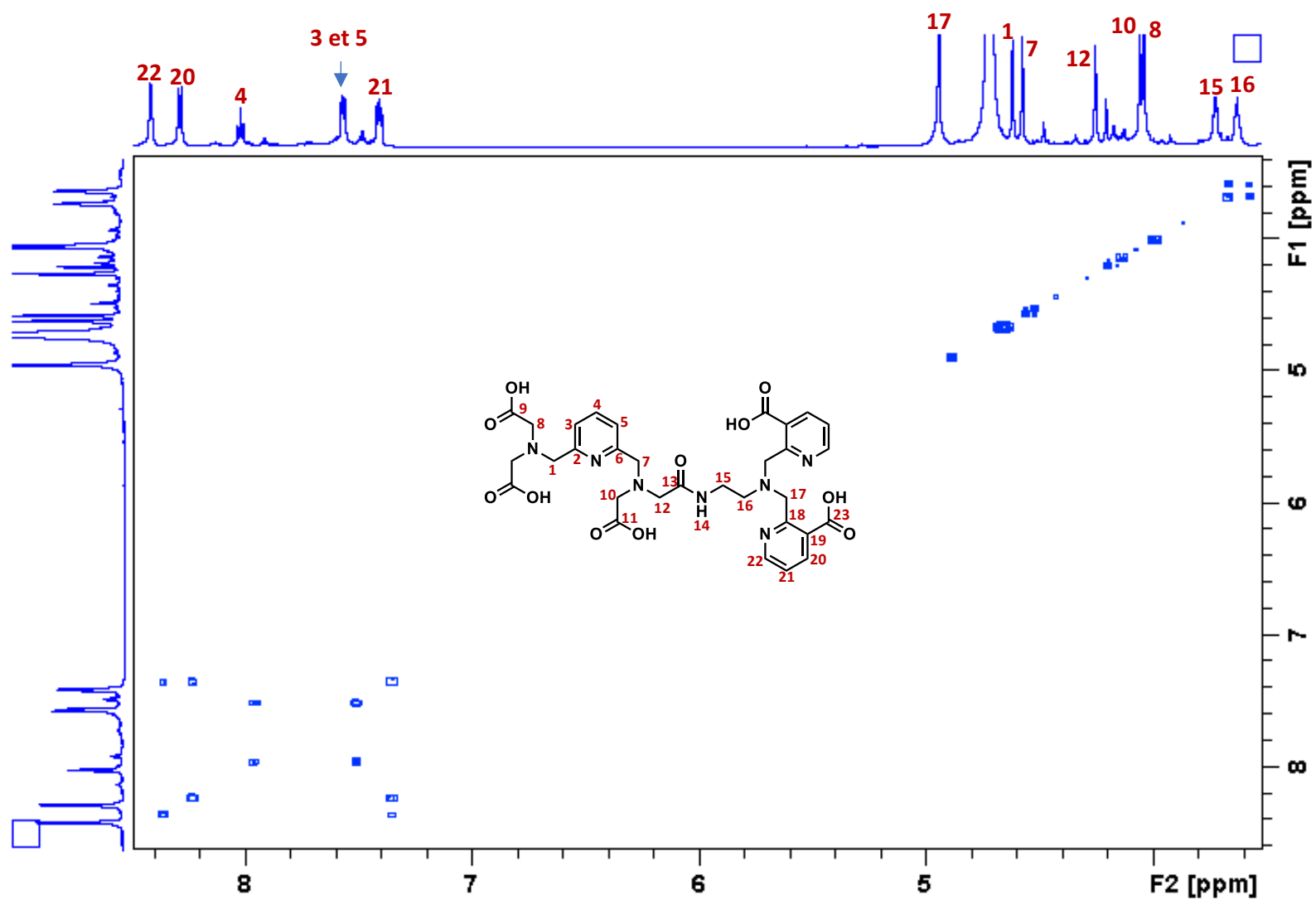
Annexe 1 : Spectre HRMS du composé 7'



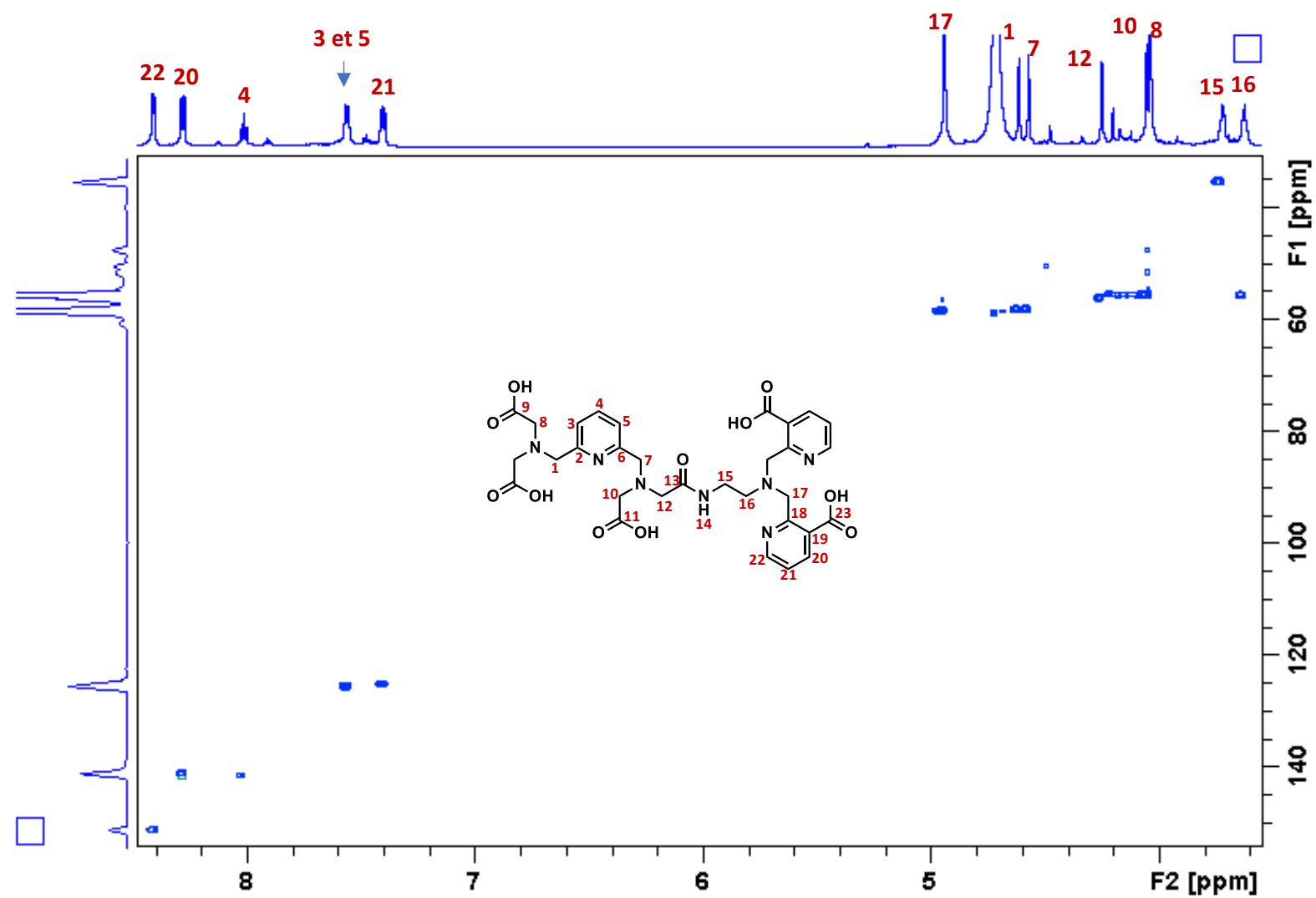
Annexe 2 : Spectre HRMS du ligand L1



Annexe 3 : Spectre COSY du ligand



Annexe 4 : Spectre HSQC du ligand L1



Annexe 5 : Equations used for the fitting of NMRD data, with the SBM model

The measured longitudinal proton relaxation rate, R_1^{obs} is the sum of the paramagnetic and diamagnetic contributions as expressed in Eq. 1, where r_1 is the proton relaxivity:

$$R_1^{obs} = R_1^d + R_1^p = R_1^d + r_1 \times c_{Gd} \quad [1]$$

The relaxivity can be divided into terms of inner and outer sphere, as follows:

$$r_1 = r_{1is} + r_{1os} \quad [2]$$

The inner sphere term is obtained in Eq. 3, where q is the number of inner sphere water molecules.⁵

$$r_{1is} = \frac{1}{1000} \times \frac{q}{55.55} \times \frac{1}{T_{1m}^H + \tau_m} \quad [3]$$

The longitudinal relaxation rate of inner sphere protons, $1/T_{1m}^H$ is expressed by Eq. 4, where r_{GdH} is the effective distance between the electron charge and the ^1H nucleus, ω_I is the proton resonance frequency and ω_S is the Larmor frequency of the Gd^{III} electron spin.

$$\frac{1}{T_{1m}^H} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \times [3J(\omega_I; \tau_{d1}) + 7J(\omega_S; \tau_{d2})] \quad [4]$$

$$\frac{1}{\tau_{di}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau} + \frac{1}{T_{ie}} \quad [5]$$

The longitudinal and transverse electronic relaxation rates, $1/T_{1e}$ and $1/T_{2e}$ are expressed by Eq. 6-7, where τ_v is the electronic correlation time for the modulation of the zero-field-splitting interaction, E_v the corresponding activation energy and Δ^2 is the mean square zero-field-splitting energy. We assumed a simple exponential dependence of τ_v versus $1/T$.

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{ZFS} = \frac{1}{25} \Delta^2 \tau_v \{4S(S+1) - 3\} \left(\frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad [6]$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{ZFS} = \Delta^2 \tau_v \left(\frac{5.26}{1 + 0.372\omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{7.18}{1 + 1.24\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad [7]$$

$$\tau_v = \tau_v^{298} \exp\left\{ \frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right) \right\} \quad [8]$$

The outer-sphere contribution can be described by Eq. 5 where N_A is the Avogadro constant, and J_{os} is its associated spectral density function.

$$r_{1os} = \frac{32N_A\pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{a_{GdH} D_{GdH}} S(S+1) [3J_{os}(\omega_I, T_{1e}) + 7J_{os}(\omega_S, T_{2e})] \quad [9]$$

$$J_{os}(\omega, T_{je}) = \text{Re} \left[\frac{1 + \frac{1}{4} \left(i\omega\tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega\tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{1/2} + \frac{4}{9} \left(i\omega\tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right) + \frac{1}{9} \left(i\omega\tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{3/2}} \right] \quad j = 1, 2 \quad [10]$$

The diffusion coefficient for the diffusion of a water proton away from a Gd^{III} complex, D_{GdH} , is assumed to obey an exponential law versus the inverse of the temperature, with an activation energy E_{GdH} , as given in Eq. 11 D_{GdH}^{298} is the diffusion coefficient at 298.15 K.

$$D_{\text{GdH}} = D_{\text{GdH}}^{298} \exp \left\{ \frac{E_{\text{GdH}}}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad [11]$$

Annexe 6 : Equations used for the fitting of NMRD data, with the SBM model including the model-free Lipari-Szabo approach

The measured longitudinal proton relaxation rate, $R_1^{obs} = 1/T_1^{obs}$, is the sum of a paramagnetic and a diamagnetic contribution as expressed in Equation (A1), where r_1 is the proton relaxivity:

$$R_1^{obs} = R_1^d + R_1^p = R_1^d + r_1 [Gd^{3+}] \quad (A1)$$

The relaxivity can be divided into an inner and an outer sphere term as follows:

$$r_1 = r_{1is} + r_{1os} \quad (A2)$$

The inner sphere term is given in Equation (A3), where q is the number of inner sphere water molecules.ⁱ

$$r_{1is} = \frac{1}{1000} \times \frac{q}{55.55} \times \frac{1}{T_{1m}^H + \tau_m} \quad (A3)$$

The longitudinal relaxation rate of inner sphere protons, $1/T_{1m}^H$ is expressed by Equation (A4), where r_{GdH} is the effective distance between the electron charge and the 1H nucleus, ω_I is the proton resonance frequency and ω_S is the Larmor frequency of the Gd^{3+} electron spin.

$$\frac{1}{T_{1m}^H} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \times [3J(\omega_I; \tau_{d1}) + 7J(\omega_S; \tau_{d2})] \quad (A4)$$

$$\frac{1}{\tau_{di}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_{RH}} + \frac{1}{T_{ie}} \quad \text{for } i = 1, 2 \quad (A5)$$

where τ_{RH} is the rotational correlation time of the $Gd-H_{water}$ vector.

For small molecular weight chelates (fast rotation), the spectral density function is expressed as in Equation (A6).

$$J(\omega; \tau) = \left(\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right) \quad (\text{A6})$$

For slowly rotating species, the spectral density functions are described the Lipari-Szabo approach.ⁱⁱ In this model we distinguish two statistically independent motions; a rapid local motion with a correlation time τ_l and a slower global motion with a correlation time τ_g . Supposing the global molecular reorientation is isotropic, the relevant spectral density functions are expressed as in Equations (A7-A11), where the general order parameter S^2 describes the degree of spatial restriction of the local motion. If the local motion is isotropic, $S^2 = 0$; if the rotational dynamics is only governed by the global motion, $S^2 = 1$.

$$J(\omega_I; \tau_{d1}) = \left(\frac{S^2 \tau_{d1g}}{1 + \omega_I^2 \tau_{d1g}^2} + \frac{(1 - S^2) \tau_{d1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{d1}^2} \right) \quad (\text{A7})$$

$$J(\omega_S; \tau_{d2}) = \left(\frac{S^2 \tau_{d2g}}{1 + \omega_S^2 \tau_{d2g}^2} + \frac{(1 - S^2) \tau_{d2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{d2}^2} \right) \quad (\text{A8})$$

$$\frac{1}{\tau_{dig}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_g} + \frac{1}{T_{ie}} \quad i = 1, 2 \quad (\text{A9})$$

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_g} + \frac{1}{\tau_l} \quad (\text{A10})$$

$$J_i(\omega_i) = \left(\frac{S^2 \tau_g}{1 + i^2 \omega_i^2 \tau_g^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + i^2 \omega_i^2 \tau^2} \right) \quad i = 1, 2 \quad (\text{A11})$$

The rotational correlation time, τ_{RH} is assumed to have simple exponential temperature dependence with an E_R activation energy as given in Equation (A12).

$$\tau_{RH} = \tau_{RH}^{298} \exp\left[\frac{E_R}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15}\right)\right] \quad (\text{A12})$$

The outer-sphere contribution can be described by Equations (A13 and A14) where N_A is the Avogadro constant, and J_{os} is its associated spectral density function as given by Equation (A14).^{iii,iv}

$$r_{los} = \frac{32 N_A \pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_S^2 \gamma_I^2}{a_{GdH} D_{GdH}} S(S+1) [3J_{os}(\omega_I, T_{1e}) + 7J_{os}(\omega_S, T_{2e})] \quad (\text{A13})$$

$$J_{os}(\omega, T_{je}) = \text{Re} \left[\frac{1 + 14 \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{1/2} + 49 \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right) + 19 \left(i\omega \tau_{GdH} + \frac{\tau_{GdH}}{T_{je}} \right)^{3/2}} \right] \quad (\text{A14})$$

$j = 1, 2$

The longitudinal and transverse electronic relaxation rates, $1/T_{1e}$ and $1/T_{2e}$ are expressed by Equation (A15 and A16), where τ_v is the electronic correlation time for the modulation of the zero-field-splitting interaction, E_v the corresponding activation energy and Δ^2 is the mean square zero-field-splitting energy. We assumed a simple exponential dependence of τ_v versus $1/T$ as written in Equation (A17).

$$\left(\frac{1}{T_{1e}} \right)^{ZFS} = \frac{1}{25} \Delta^2 \tau_v \{ 4S(S+1) - 3 \} \left(\frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad (\text{A15})$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{ZFS} = \Delta^2 \tau_v \left(\frac{5.26}{1 + 0.372 \omega_s^2 \tau_v^2} + \frac{7.18}{1 + 1.24 \omega_s \tau_v} \right) \quad (A16)$$

$$\tau_v = \tau_v^{298} \exp \left[\frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298.15} \right) \right] \quad (A17)$$

The diffusion coefficient for the diffusion of a water proton away from a Gd³⁺ complex, D_{GdH} , is assumed to obey an exponential law versus the inverse of the temperature, with activation energy E_{DGdH} , as given in Equation (A18). D_{GdH}^{298} is the diffusion coefficient at 298.15 K.

$$D_{GdH} = D_{GdH}^{298} \exp \left\{ \frac{E_{GdH}}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (A18)$$

In the analysis of the data, several parameters have been fixed to common values. Among these, r_{GdO} has been fixed to 2.5, based on available crystal structures and electron nuclear double resonance (ENDOR) results,^v and the quadrupolar coupling constant, $\chi(1+\eta^2/3)^{1/2}$, has been set to the value for pure water 7.58 MHz.^{vi}[41] The Gd–water proton distance was fixed to r_{GdH} =3.1, and the closest approach between the Gd(III) ion and the outer-sphere protons to a_{GdH} =3.6.

ⁱ Luz Z, Meiboom S J Chem Phys 1964 40, 2686–2692.

ⁱⁱ Dunand FA, Tóth E, Hollister R, Merbach AE . J Biol Inorg Chem 2001 6, 247–255.

ⁱⁱⁱ Freed JH J Chem Phys 1978 68, 4034–4037.

^{iv} Koenig SH, Brown RD, Spiller M, et al. Biophys J 1992 61, 776–785.

^v Caravan P, Ellison J.J., McMurry T.J., Lauffer R.B., Chem. Rev. 1999, 99, 2293-2352.

^{vi} Halle B., Wennerstrom H., J. Chem. Phys. 1981, 75, 1928-1943.

Agents de contraste pour la détection quantitative du Zn(II) par IRM

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est classiquement utilisée pour l'obtention d'images anatomiques et fonctionnelles. L'émergence de l'imagerie moléculaire, qui cherche à visualiser des modifications biochimiques apparaissant de manière plus précoces que les changements morphologiques, nécessite l'utilisation de sondes spécifiques du processus à détecter. Cela a conduit à la conception de nouveaux agents de contraste IRM « intelligents » à base de Gd(III).

La détection du Zn(II) reste un enjeu important du fait de son rôle dans les processus physiologiques et son implication dans diverses pathologies. Un des problèmes majeurs à surmonter est sa quantification. Dans cette perspective, nous avons développé des sondes bimodales variant uniquement par la nature du Ln(III) : Gd(III) pour l'IRM (technique responsive) et $^{165}\text{Er(III)}$ pour la tomographie par émission monophotonique (technique quantitative). Ces sondes sont composées d'un complexe de Ln(III) à base de pyridine relié à un motif DPA (dipicolylamide) ou DPA modifié pour la complexation du Zn(II) via un espaceur.

Nous nous sommes d'abord attachés à optimiser la réponse des complexes de Gd(III) au Zn(II). Nous avons augmenté la stabilité thermodynamique des complexes de Ln(III) par ajout d'une fonction carboxylate sur le ligand. Cette famille de complexes répond au Zn(II) en présence de HSA (Albumine sérique humaine) par modification du temps de corrélation rotationnel. Nous avons ensuite réalisé une étude structurale afin de rationaliser les paramètres importants pour optimiser la réponse au Zn(II) en présence de HSA et/ou la sélectivité, en particulier vis-à-vis du Cu(II). Nous avons également développé une famille de molécules répondant à la présence de Zn(II) par variation modeste du nombre d'hydratation q .

Finalement nous avons pu valider l'utilisation de l' $^{165}\text{Er(III)}$ pour la détection quantitative *in vitro* de Zn(II).

Mots clés : IRM, agents de contraste, relaxivité, zinc, lanthanides, TEMP, stabilité thermodynamique, HSA, Imagerie Moléculaire, imagerie nucléaire.

MRI contrast agents for Zn(II) quantitative detection

Magnetic Resonance Imaging (MRI) has long been devoted to obtain anatomical and functional images. Recently the development of molecular imaging, which seeks to obtain biochemical and physiopathological information, requires the use of a probe specific to the molecular event to be detected. This has led to the development of new "smart" Gd(III)-based contrast agents.

Zn(II) detection remains of prime importance due to its implication in biological processes and diseases. One of the major challenges is its quantitative detection. To this aim, we have developed an approach based on bimodal probes which differs only by the Ln(III) used : Gd(III) for MRI (responsive technique) and $^{165}\text{Er(III)}$ for single photon emission computed tomography (quantitative technique). These probes are based on a pyridine-Ln(III) unit linked to a DPA (dipicolylamide) motif for Zn(II) complexation through a spacer.

First, we have optimized the Zn(II) response of the Gd(III) complexes. We have improved the thermodynamic stability of the Ln(III) complexes by adding a carboxylate function to the ligand. This family of complexes respond to Zn(II) in the presence of HSA (Human Serum Albumin) by changes of the rotational correlation time. We have then performed a structural study to point out important parameters to optimize the Zn(II) response and/or the selectivity, especially versus Cu(II). We have also developed a family of molecules responding to Zn(II) by modest variation of the hydration number q .

Finally, we validated the use of $^{165}\text{Er(III)}$ for the *in vitro* quantitative detection of Zn(II).

Keywords: MRI, contrast agents, relaxivity, zinc, lanthanides, SPECT, thermodynamic stability, HSA, molecular imaging, nuclear imaging.